

Untersuchungen zur Bildung und Funktion von IL-22 bei entzündungsbedingter Immunaktivierung

DISSERTATION

**zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften**

**vorgelegt beim Fachbereich
Biochemie, Chemie und Pharmazie (FB 14)
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main**

von

**Elisabeth Ziesché
aus Dessau / Anhalt**

Frankfurt 2008

(D30)

Vom Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie der Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Harald Schwalbe

1. Gutachter: Prof. Dr. Dieter Steinhilber

2. Gutachter: PD Dr. Heiko Mühl

Datum der Disputation:

Für Sven und meine Familie.

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
---------------------------	----------

ABBILDUNGSVERZEICHNIS	VI
------------------------------	-----------

TABELLENVERZEICHNIS	VII
----------------------------	------------

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VIII
------------------------------	-------------

1	<u>EINLEITUNG</u>	1
1.1	EINBLICKE IN DAS MENSCHLICHE IMMUNSYSTEM	1
1.1.1	GENERELLE EIGENSCHAFTEN VON ZYTOKINEN	3
1.1.2	ZYTOKINE STEuern DIE DIFFERENZIERUNG DER T- LYMPHOZYTEN	4
1.2	INTERLEUKIN-22	7
1.2.1	DIE IL-10-ZYTOKINFAMILIE	7
1.2.2	IL-22 IST EIN T _H 17- ZYTOKIN	8
1.2.3	DER IL-22-REZEPTORKOMPLEX VERMITTELT DIE SIGNALTRANSDUKTION DES ZYTOKINS	8
1.3	IL-22 REGULIERT DIE BIOLOGIE EPITHELIALER ZELLEN	11
1.3.1	BIOLOGISCHE EFFEKTE VON IL-22 IN LEBER UND PANKREAS	11
1.3.2	BIOLOGISCHE EFFEKTE VON IL-22 IN DER HAUT	12
1.3.3	BIOLOGISCHE EFFEKTE VON IL-22 IM INTESTINALTRAKT	13
1.4	DIE FUNKTION VON IL-22 IN DER IMMUNANTWORT	14
1.4.1	DIE ROLLE VON IL-22 BEI AUTOIMMUNERKRANKUNGEN	14
1.4.2	DIE ROLLE VON IL-22 BEI INFESTIONEN	18

1.5	DIE INDUZIERBARE NO-SYNTASE (iNOS) FÖRDERT CHRONISCHE ENTZÜNDUNGEN UND DIE KARZINOGENESE AN EPITHELIIEN	20
1.5.1	STICKSTOFFMONOXID-SYNTASEN	20
1.5.2	REGULATION DER iNOS-EXPRESSION	21
1.5.3	NO FÖRDERT DIE ENTWICKLUNG ENTZÜNDLICHER ERKRANKUNGEN	24
1.5.3.1	NO SCHÄDIGT ZELLULÄRE DNA UND PROTEINE	24
1.5.3.2	NO FÖRDERT DIE TUMORPROGRESSION	25
1.6	SEPSIS UND DIE FOLGE EINER GESTÖRTE BARRIEREFUNKTION DES EPITHEL	27
1.6.1	IMMUNPATHOGENESE DER SEPSIS	27
1.7	ZIELE DIESER ARBEIT	30
2	MATERIAL UND METHODEN	31
2.1	ALLGEMEINE MATERIALIEN UND GERÄTE	31
2.1.1	CHEMIKALIEN	31
2.1.2	INHIBITOREN	31
2.1.3	REKOMBINANTE PROTEINE, PHARMAKA, STIMULI UND LÖSEMittel	31
2.1.4	ANTI-KÖRPER	32
2.1.5	KITS	32
2.1.6	PUFFER	33
2.1.7	SONSTIGE MATERIALIEN	33
2.1.8	GERÄTE	34
2.1.9	STATISTIK	35
2.2	BAKTERIENKULTUR	35
2.2.1	HERSTELLUNG CHEMISCH-KOMPETENTER BAKTERIEN	35
2.2.2	RETRANSFORMATION CHEMISCH-KOMPETENTER BAKTERIEN	35
2.2.3	PRÄPARATIVE PLASMIDISOLIERUNG	36
2.3	ZELLKULTUR	36
2.3.1	ZELLKULTURMEDIIEN UND ZUSÄTZE	36
2.3.2	ZELLINIEN	37
2.3.3	KULTIVIERUNG DER ZELLINIEN	37
2.3.4	EINFRIEREN UND AUFTAUEN VON ZELLEN	38

2.3.5	TRANSIENTE TRANSFEKTION VON ZELLEN	38
2.3.5.1	TRANSFEKTION VON ZELLEN MIT siRNA	38
2.3.5.2	TRANSFEKTION VON ZELLEN MIT PLASMIDEN	39
2.3.6	ISOLIERUNG HUMANER PBMC	39
2.4	MOLEKULARBIOLOGISCHE TECHNIKEN	40
2.4.1	ISOLIERUNG VON RNA AUS EUKARYOTISCHEN ZELLEN	40
2.4.2	ISOLIERUNG VON RNA AUS TIERISCHEN ORGANEN	41
2.4.3	KONZENTRATIONSBESTIMMUNG VON NUKLEINSÄUREN	41
2.4.4	RNASE-VERDAU-SCHUTZANALYSE (RNASE PROTECTION ASSAY; RPA)	42
2.4.5	REVERSE TRANSKRIPTION (RT)	45
2.4.6	POLYMERASE-KETTENREAKTION (PCR)	45
2.4.6.1	QUANTITATIVE UND SEMIQUANTITATIVE REAL TIME – PCR	47
2.4.7	AUFTRENNUNG VON NUKLEINSÄUREN IM AGAROSEGEL	50
2.4.7.1	RNA-GELELEKTROPHORESE	50
2.4.7.2	DNA-GELELEKTROPHORESE	51
2.4.8	DNA-EXTRAKTION AUS AGAROSEGELEN	52
2.4.9	SEQUENZIERUNG VON DNA	52
2.5	PROTEINBIOCHEMISCHE TECHNIKEN	53
2.5.1	ISOLIERUNG VON PROTEINEN	53
2.5.1.1	GESAMTPROTEINZELLEXTRAKTE	53
2.5.1.2	NUKLEÄRE EXTRAKTE	53
2.5.1.3	TCA-FÄLLUNG ZUR ISOLATION SEZERNIERTER PROTEINE IM ZELLKULTURÜBERSTAND	54
2.5.2	PROTEINBESTIMMUNG NACH BRADFORD	55
2.5.3	SDS-POLYACRYLAMIDGELELEKTROPHORESE (SDS-PAGE)	55
2.5.4	<i>SEMI-DRY</i> WESTERN BLOT UND PROTEINDETEKTION MITTELS ANTIKÖRPERN	56
2.5.5	ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA)	58
2.5.6	ELECTROPHORETIC MOBILITY SHIFT ASSAY (EMSA)	58
2.5.7	LUCIFERASE-REPORTERGEN-ASSAY	60
2.5.8	BESTIMMUNG DER iNOS-AKTIVITÄT (GRIESS-ASSAY)	61
2.6	TIEREXPERIMENTELLE METHODEN	61
2.6.1	TIERE UND ANÄSTHESIE	62
2.6.2	LIGATION UND INZISION DES CAECUM	63

2.7	PATIENTEN MIT PERITONITIS-BEDINGTER SEPSIS UND KONTROLLGRUPPEN	65
2.7.1	PATIENTEN MIT PERITONITIS-BEDINGTER SEPSIS	65
2.7.2	KONTROLLGRUPPEN	66
3	ERGEBNISSE	67
3.1	IL-22 VERMITTELT ÜBER STAT3 DIE INDUKTION DER INOS-EXPRESSION IN HUMANEN EPITHELIALEN KOLONKARZINOMZELLEN	67
3.1.1	DLD-1 KOLONKARZINOMZELLEN REAGIEREN RESPONSIV AUF IL-22	67
3.1.2	IL-22 UND IFN γ WIRKEN SYNERGISTISCH AUF DIE INOS-EXPRESSION IN DLD-1 KOLONKARZINOMZELLEN	69
3.1.3	HEMMUNG DER STAT3-EXPRESSION DURCH siRNA-TECHNOLOGIE REDUZIERT DIE IL-22/IFN γ -INDUZIERTER INOS-EXPRESSION IN DLD-1 ZELLEN	73
3.1.4	IL-22 VERSTÄRKT DIE AKTIVIERUNG DES HUMANEN INOS-PROMOTORS	74
3.1.5	IRF-1, NF κ B UND GAS-ELEMENTE HABEN IN DER IL-22-VERMITTELTEN INOS-INDUKTION KEINE RELEVANZ	76
3.1.6	IL-22 HAT KEINEN EINFLUSS AUF DIE INOS mRNA-STABILITÄT	79
3.1.7	IL-22 IST KEIN GENERELLER VERSTÄRKER VON IFN γ -ANTWORTEN	80
3.2	IL-22-SEKRETION IN DER SEPSIS	82
3.2.1	IL-22-SEKRETION IN AKTIVIERTEN HUMANEN PBMC	82
3.2.2	DEXAMETHASON HEMMT DIE IL-22-SEKRETION IN AKTIVIERTEN HUMANEN PBMC	84
3.2.3	DEXAMETHASON HEMMT DIE IL-22-SEKRETION IM AKUTEN MODELL DER SCHWEREN SEPSIS IN RATTEN	87
3.2.4	DIE IL-22-SEKRETION IST BEI EINER PERITONITIS-BEDINGTEN SEPSIS ERHÖHT	91
4	DISKUSSION	93
4.1	IL-22 VERMITTELT ÜBER STAT3 DIE INDUKTION DER INOS-EXPRESSION IN HUMANEN EPITHELIALEN KOLONKARZINOMZELLEN	93
4.2	INTERLEUKIN-22 IN DER SEPSIS	101

<u>5</u>	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	<u>113</u>
<u>6</u>	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	<u>115</u>
	<u>ANHANG</u>	<u>153</u>
	<u>DANKSAGUNG</u>	<u>156</u>
	<u>ERKLÄRUNG</u>	<u>157</u>
	<u>EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG</u>	<u>157</u>
	<u>LEBENS LAUF</u>	<u>158</u>

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1	Unterschiede zwischen der humanen und murinen T-Zelldifferenzierung	6
Abbildung 1.2	Schematische Darstellung der IL-22-vermittelten STAT3-Aktivierung	10
Abbildung 1.3	Die Beeinflussung der iNOS-Stabilität reguliert die iNOS-Translation in DLD-1 Zellen	24
Abbildung 1.4	Die Rolle von iNOS/NO in der Karzinogenese	26
Abbildung 2.1	Tracheotomie und arterielle/venöse Kanülierung	63
Abbildung 2.2	Ligation und Inzision des Caecum	64
Abbildung 3.1	DLD-1 Kolonkarzinomzellen exprimieren den IL-22-Rezeptorkomplex	67
Abbildung 3.2	DLD-1 Kolonkarzinomzellen reagieren responsiv auf IL-22	69
Abbildung 3.3	IL-22 und IFN γ wirken synergistisch auf die iNOS mRNA-Expression in DLD-1 Kolonkarzinomzellen	70
Abbildung 3.4	IL-22 und IFN γ wirken synergistisch auf die iNOS-Proteinexpression in DLD-1 Kolonkarzinomzellen	72
Abbildung 3.5	Hemmung der STAT3-Expression durch siRNA-Technologie vermindert die Induktion von iNOS durch IL-22/IFN γ	74
Abbildung 3.6	IL-22 verstärkt die basale iNOS-Promotoraktivität	75
Abbildung 3.7	IRF-1, NF κ B und GAS-Elemente haben bezüglich der IL-22-vermittelten iNOS-Induktion keine Relevanz	78
Abbildung 3.8	IL-22 hat keinen Einfluss auf die iNOS mRNA-Stabilität	79
Abbildung 3.9	IL-22 ist kein genereller Verstärker von IFN γ -Antworten	81
Abbildung 3.10	Induktion der IL-22-Sekretion durch PHA, TLR-Liganden und proinflammatorische Zytokine	83
Abbildung 3.11	Kinetik der <i>S. epidermidis</i> -induzierten IL-22-Sekretion	84
Abbildung 3.12	Dexamethason ist ein potenter Inhibitor der <i>S. epidermidis</i> -induzierten IL-22-Sekretion	86
Abbildung 3.13	Erhöhte IL-22-Plasmaspiegel im Verlauf einer bakteriellen Peritonitis in Ratten	88
Abbildung 3.14	Dexamethason hemmt die Expression klassischer proinflammatorischer Zytokine bzw. Chemokine im CLI-Modell	89
Abbildung 3.15	Dexamethason hemmt die IL-22-Expression im CLI-Modell	90
Abbildung 3.16	Analyse der mRNA-Expression von IL-22 und IL-17 im CLI-Modell	91
Abbildung 3.17	Die IL-22-Sekretion ist bei einer Peritonitis-bedingten Sepsis erhöht	92
Abbildung 4.1	Die Rolle von iNOS/NO in der Karzinogenese und Tumorprogression	95

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1	Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	56
Tabelle 2.2	Zusammensetzung des nativen Polyacrylamidgels zur Analyse der Protein-DNA-Komplexe im EMSA	60
Tabelle 4.1	Diagnosekriterien für SIRS, Sepsis, schwere Sepsis und septischen Schock	102

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
AP-1	activating protein 1
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARE	AU-rich element
ATP	Adenosintriphosphat
AUF	AU binding factor
BGA	Blutgasanalyse
BH ₄	Tetrahydrobiopterin
BP	Bindungsprotein
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CARS	compensatory anti-inflammatory response syndrome
CCL	Chemokine (C-C motif) ligand
CCR	Chemokine (C-C motif) receptor
CD	cluster of differentiation
cDNA	komplementäre DNA
CLI	caecum ligation and incision
CLP	caecum ligation and puncture
ConA	Concanavalin A
COX	Cyclooxygenase
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanosin
CRF	cytokine receptor family
CT	threshold cycle
CTP	Cytosintriphosphat
CXCL	Chemokine (C-X-C motif) ligand
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA(S)	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EAE	experimentelle Autoimmunenzephalitis
EBI3	Epstein-Barr virus (EBV)-induced gene 3
ECL	enhanced chemoluminescence
EDRF	endothelium-derived relaxation factor

EDTA	Ethylendiamintetraazetat
EGDT	early goal-directed therapy
EGFR	epidermal growth factor receptor
EGTA	Ethylenglykoltetraazetat
EHEC	enterohämorrhagische Escherichia coli
ELAV	embryonic lethal abnormal vision
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
EMSA	electrophoretic mobility shift assay
eNOS	endotheliale NO-Synthase
EPEC	enteropathogene Escherichia coli
ERK	extracellular regulated kinase
FAD	Flavinadenindinukleotid
Fc	fragment crystallizable
FKS	fötales Kälberserum
FMN	Flavinmononukleotid
G	Guanin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GAS	γ activated sites
GATA	transcription factor binding to the nucleotide sequence element (A/T)GATA(AG)
GOI	gene of interest
GTP	Guanosintriphosphat
hBD	humanes β -Defensin
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HIV	humanes Immundefizienz-Virus
hnRNP	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein
HS	humanes Serum
HuR	human antigen R
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
I-FABP	intestinal fatty acid binding protein
IFN γ	Interferon γ
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IL-TIF	IL-10 related T cell derived inducible factor
iNOS	induzierbare NO-Synthase
IP-10	interferon-inducible protein-10
IRF	interferon regulatory factor

JAK	Janus kinase
JNK	c-Jun N-terminal kinase
kDa	kiloDalton
KG	Körpergewicht
KSRP	KH-type splicing regulatory protein
LB	lysogeny broth
LBP	LPS-Bindungsprotein
LIF	leukaemia inhibitory factor
LPS	Lipopolysaccharid
LTA(S)	Lipoteichonsäure
MAPK	mitogen-activated protein kinase
mda-7	melanoma differentiation associated gene 7
MHC	major histocompatibility complex
MIG-9	monokine induced by gamma interferon
MIP-2 α	macrophage inflammatory protein 2 α
MMP	Matrixmetalloprotease
MOPS	3-N-Morpholinopropansulfonsäure
n/bNOS	neuronale/brain NO-Synthase
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
NF κ B	nuclear factor κ B
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NOD	nucleotide-binding oligomerization domain
OA	Oberarzt
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAMP	pathogen associated molecular patterns
PAP	Pankreas-assoziiertes Protein
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PDAR	pre-developed assay reagents
PEEP	positiver endexpiratorischer Druck
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PHA	Phytohämagglutinin
PIPES	Piperidin-1,4-bis-(2-ethansulfonsäure)
PKB	Proteinkinase B
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PNK	Polynukleotid-Kinase

PTB	polypyrimidine tract-binding protein
R	Rezeptor
Rag-1/2	rekombinationsaktivierende Gene 1/2
RG	Referenzgen
RLU	relative light units
RNA(S)	Ribonukleinsäure
ROR γ t	retinoic acid related orphan receptor γ t
RPA	Rnase protection assay
RT	Raumtemperatur oder Reverse Transkriptase/Transkription
SAA	Serum-Amyloid A
SAPS	simplified acute physiology score
SDS	sodium dodecyl sulfate
SEM	standard error of the mean
siRNA	silencing RNA
SIRS	systemic inflammatory response syndrome
SOCS	suppressor of cytokine signaling
SOFA	sepsis-related organ failure assesement
STAT	signal transducer and activator of transcription
T	Thymin
T-bet	T-box transcription factor expressed in T cells
TCA	trichloroacetic acid
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF β	transforming growth factor β
T _H	T-Helferzelle
TIAR	T cell-restricted intracellular antigen-1-related protein
TJ	tight junctions
TLR	Toll-like-Rezeptoren
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF α	Tumornekrosefaktor α
TSST-1	toxic shock syndrome toxine 1
TTP	Tristetraprolin
Tyk	Tyrosin-Kinase
UTP	Uridintriphosphat
UTR	untranslated region
VEGF	vascular endothelial growth factor
VT	Volumenteil

1 Einleitung

1.1 Einblicke in das menschliche Immunsystem

Im Laufe der Evolution wurde es für mehrzellige Organismen notwendig, komplexe und effektive Abwehrmechanismen zu entwickeln. Diese bieten ihnen Schutz gegen die permanente Bedrohung durch pathogene Bakterien, Pilze, Viren und Parasiten. Die Abwehrmechanismen basieren dabei auf dem Erkennen von strukturellen Komponenten fremder Organismen, die sie von den Wirtszellen unterscheiden. Diese Differenzierung zwischen Wirt und Pathogen ist essentiell, um dem Wirt die Eliminierung des Pathogens zu ermöglichen, ohne dabei das eigene Gewebe zu schädigen [1]. Das menschliche Immunsystem lässt sich prinzipiell in zwei Bereiche unterteilen: das angeborene (natürliche) und das erworbene (adaptive) Immunsystem.

Das angeborene Immunsystem bildet die erste Abwehrlinie zur Bekämpfung pathogener Organismen. Es erkennt molekulare Muster, die von vielen Mikroorganismen exprimiert werden, wobei der Grund für die „fehlende“ Induktion einer Immunantwort durch kommensale Bakterien noch nicht geklärt ist. Die Erkennung dieser *pathogen associated molecular patterns* (PAMP) erfolgt unter anderem über *Toll-like-Rezeptoren* (TLR) [2], welche von einer Vielzahl an Zellen exprimiert werden. Dies gewährt eine schnelle Reaktion auf das Pathogen und induziert eine initiale Immunabwehr. Zur angeborenen Immunität sind ebenfalls anatomische und physiologische Barrieren zu zählen. Neben den Epithelien gehören auch die Schleimhäute dazu, welche die Epithelien im Respirationstrakt, im Gastrointestinaltrakt und im Urogenitaltrakt auskleiden. Die epithelialen Zilien sorgen dabei für eine konstante Erneuerung der Schleimschichten. Die angeborene Immunabwehr beinhaltet gleichermaßen bioaktive Moleküle wie Komplementfaktoren und Defensine, welche konstitutiv in Körperflüssigkeiten vorhanden sind [3, 4] sowie sezernierte Proteine aktivierter Zellen (Zytokine, Chemokine, Lipidmediatoren), die eine zellvermittelte Abwehr und Entzündungsreaktion induzieren. Bei der zellvermittelten Abwehr der angeborenen Immunität spielen phagozytierende Zellen und **Natürliche Killerzellen** (NK-Zellen) eine bedeutende Rolle. Phagozytierende Zellen eliminieren Pathogene und zerstören diese über intrazellulär gespeicherte toxische Effektormoleküle wie reaktive Sauerstoffspezies oder Stickstoffmonoxid (NO). Zusätzlich exprimieren sie Fc- und

Komplementrezeptoren, um die Erkennung pathogener Mikroorganismen zu verstärken. Die NK-Zellen besitzen keine antigenspezifischen Rezeptoren. Sie zerstören die Zielzelle entweder über eine antikörperabhängig zellvermittelte Zytotoxizität via Fc-Rezeptor oder sie eliminieren virusinfizierte Zellen über einen antikörperunabhängigen Fas/Fas-Ligand-vermittelten Mechanismus [5].

Die angeborene Immunität wird durch Gene kodiert, welche relativ unverändert über die Keimbahn weitergegeben werden. Bei der adaptiven Immunität dagegen resultiert die somatische Genrekombination der vererbten Gensegmente während der Entwicklung der Lymphozyten in einer Ausbildung von antigenbindenden Molekülen (Rezeptoren) auf der Oberfläche von T- (T-Zellrezeptor) und B-Lymphozyten (Immunglobuline). Diese besitzen eine außerordentliche Spezifität für individuell einzigartige mikrobielle Strukturen (Antigene) [1]. Das adaptive Immunsystem besteht zunächst nur aus einer geringen Population an Lymphozyten mit hoher Spezifität für ein bestimmtes Antigen. Um genügend spezifische Effektor-Lymphozyten zur Bekämpfung einer Infektion zu erzeugen, muß ein aktivierter Lymphozyt nach dem ersten Kontakt mit „seinem“ Antigen proliferieren (klonale Expansion) und reifen, um seine Affinität zu erhöhen. Schließlich differenzieren die Nachkommen zu Effektorzellen, um den Erreger zu vernichten bzw. um andere Zellen und nachfolgende Abwehrmechanismen zu aktivieren. Da die klonale Expansion und Differenzierung erst nach vier bis fünf Tagen abgeschlossen ist, wird die adaptive Immunantwort erst mit Verzögerung induziert. Effektorzellen haben nur eine begrenzte Lebensdauer. Wenn das Antigen nicht mehr vorhanden ist, durchlaufen die meisten antigenspezifischen Zellen einen programmierten Zelltod (Apoptose). Einige der Zellen überleben jedoch und bilden die Grundlage des immunologischen Gedächtnisses. Dadurch wird eine schnellere und wirksamere Reaktion auf eine erneute Infektion mit demselben Erreger ermöglicht [1]. Generell handeln das angeborene und das erworbene Immunsystem stets in Einklang miteinander, wobei die angeborene Immunität die erste Verteidigungslinie im Organismus darstellt und die erworbene Immunität der Immunabwehr aufgrund der verzögerten klonalen Expansion zeitlich versetzt beiträgt. Obwohl die beiden Zweige fundamental verschieden sind, ist ihre koordinierte Funktion und synergistische Interaktion unabdingbar für eine intakte und effiziente Immunabwehr [1].

1.1.1 Generelle Eigenschaften von Zytokinen

Zytokine sind kleine Proteine mit einem Molekulargewicht, das zumeist zwischen acht und 40kDa liegt. Als Signalmoleküle vermitteln sie die Kommunikation zwischen den Zellen und wirken bei der Regulation von Immunabwehr und Entzündung mit. Zusätzlich leisten sie gleichermaßen einen Beitrag bei der zellulären Stressantwort sowie bei Zellwachstum und –differenzierung. Viele Zytokine werden auch als Interleukine bezeichnet, da sie oft von Leukozyten sezerniert werden und primär im leukozytären Zellkompartiment wirken. Das in dieser Arbeit untersuchte Interleukin (IL)-22 dagegen mediiert keine autokrine bzw. parakrine Aktivierung von Leukozyten. Es wirkt ausschließlich auf lokal residierende Gewebezellen (siehe Kapitel 1.2.3). Im Gegensatz zu Hormonen, welche von spezialisierten Zellen gebildet werden, können Zytokine von einer Vielzahl verschiedener Zellen produziert werden. Dazu zählen insbesondere Makrophagen, NK-Zellen sowie T- und B-Lymphozyten. Obwohl sie sich strukturell unterscheiden, weisen sie doch einige Gemeinsamkeiten auf. Zytokine werden bis auf wenige Ausnahmen nicht in den Zellen gespeichert. Vielmehr wird die *de novo*-Synthese durch eine zelluläre Aktivierung initiiert und anschließend erfolgt meist die sofortige Sekretion. Zusätzlich kann die Bildung der Zytokine über RNA-Prozessierung oder posttranslationeller Mechanismen, wie die proteolytische Freisetzung aktiver Zytokine aus inaktiven Vorläuferprodukten, kontrolliert werden. Bei der Wirkungsweise von Zytokinen spielt ihr Pleiotropismus und ihre Redundanz eine wichtige Rolle. Der Pleiotropismus beschreibt die Fähigkeit eines Zytokins, in verschiedenen Zelltypen diverse biologische Effekte zu bewirken und die Redundanz bezieht sich auf die Eigenschaft, dass mehrere Zytokine in einem bestimmten Zelltyp den gleichen funktionellen Effekt auslösen können. Diese Aspekte begrenzen den therapeutischen Einsatz von Zytokinen und dieses Phänomen spiegelt sich auch in aktuellen klinischen Studien wider, die zeigen, dass die Gabe von $\text{IFN}\gamma$ den Verlauf der Multiplen Sklerose drastisch verschlechtern kann [6], obwohl $\text{IFN}\gamma$ einige antientzündliche Eigenschaften besitzt. Im Gegensatz dazu ist die Therapie mit Antikörpern gegen $\text{TNF}\alpha$ ein triumphaler Erfolg bei der Behandlung von Rheumatoider Arthritis und *Morbus Crohn* [7]. Eine wichtige Funktion im Immunsystem ist die Eigenschaft der Zytokine, die Synthese oder biologischen Effekte anderer Zytokine zu beeinflussen. Dabei spielen Aktivierung sowie Hemmung gleichermaßen eine Rolle. Für die Wirkung der Zytokine ist zu beachten, dass sie sowohl lokal als auch systemisch agieren können. Zytokine können entweder auf die sezernierende Zelle (autokrin) oder auf benachbarte Zellen (parakrin) wirken. Sollten

Zytokine in großen Mengen produziert werden, können sie auch in die Blutzirkulation gelangen und so an entfernten Orten ihre Wirkung entfalten (endokrin). Generell können Zytokine ihren biologischen Effekt nur dann vermitteln, wenn die Zielzelle einen entsprechenden spezifischen Rezeptor auf ihrer Zelloberfläche exprimiert. Diese Zytokinrezeptoren binden ihre Liganden mit einer sehr hohen Affinität, so dass minimale Zytokinkonzentrationen einen maximalen Effekt erzielen. Externe Signale regulieren die Expression der Rezeptoren und beeinflussen so die Empfänglichkeit der Zellen gegenüber Zytokinen. So erfolgt beispielsweise nach Aktivierung von T-Lymphozyten durch Antigene eine vermehrte Expression eines hochaffinen IL-2-Rezeptorkomplexes. Durch die Bindung von IL-2 an seinen Rezeptor wird nunmehr die Proliferation der T-Lymphozyten induziert. Gleichmaßen können Zytokine die Expression ihres „eigenen“ Rezeptors über eine positive oder negative Rückkopplung regulieren. Die induzierte intrazelluläre Reaktion vieler Zytokine basiert auf Änderungen im Genexpressionsmuster der Zelle. Dies resultiert beispielsweise in der Differenzierung von B- und T-Lymphozyten oder in der Aktivierung von Makrophagen und anderen Effektorzellen.

1.1.2 Zytokine steuern die Differenzierung der T- Lymphozyten

Vor über 20 Jahren wurde erstmals gezeigt, dass die Effektorzellen der T-Lymphozyten basierend auf ihrem Zytokinprofil in zwei eigenständige Subpopulationen unterteilt werden können [8, 9]. Nach dem ersten Kontakt mit einem spezifischen Antigen differenzieren naive CD4⁺ T_{H0}-Zellen in T_{H1}- oder T_{H2}-Zellen. Diese Differenzierung wird über IL-12/IFN γ bzw. IL-4 gesteuert, welche von antigenpräsentierenden Zellen sezerniert werden [10]. Die phänotypische Differenzierung der T-Helferzellen verläuft schrittweise und beinhaltet koordinierte Signalkaskaden und Zellteilungen, welche schließlich ein epigenetisches Gedächtnis für die Produktion spezifischer Zytokine generiert. Für die T_{H1}-Differenzierung via IL-12 und IL-18 ist der Transkriptionsfaktor *signal transducer and activator of transcription* (STAT) 4 essentiell. Zusätzlich spielt der IL-27-Signalweg über STAT1 eine wichtige Rolle in der frühen Differenzierungsphase. Das Zusammenwirken beider Signalwege aktiviert schließlich den Hauptschalter der T_{H1}-Differenzierung – *T-box transcription factor expressed in T cells* (T-bet), welcher gleichzeitig die T_{H2}-Differenzierung hemmt. T_{H1}-Zellen werden primär zur Abwehr intrazellulärer Pathogene (Viren, Mykobakterien, Listerien etc.) induziert. Zu den typischen T_{H1}-sezernierten Zytokinen zählen IFN γ , IL-2

und TNF β . Für die T_H2-Differenzierung ist die IL-4 induzierte Aktivierung der Transkriptionsfaktoren STAT6 und GATA3 (*transcription factor binding to the nucleotide sequence element (A/T)GATA(AG)*) notwendig. GATA3 hemmt seinerseits die T_H1-Differenzierung. T_H2-Zellen werden wiederum zur Abwehr extrazellulärer Pathogene bzw. Antigene (Parasiten, Bakterien, Allergene) aktiviert und sezernieren IL-3/-4/-5/-9/-10/-13 und IL-25. Neuere Erkenntnisse zeigen, dass die klassische Differenzierung in die Effektorpopulationen T_H1 und T_H2 aktualisiert werden muss. Naive CD4⁺ T_H0-Zellen können auch in T_H17-Zellen differenzieren [11, 12] und zeichnen sich in Abhängigkeit der Spezies durch die Produktion der Zytokine IL-17A [13], IL-17F [14], IL-21 [15, 16], IL-22 [17, 18] und IL-26 [18] aus. Dagegen scheint die beschriebene Sekretion von IL-6 durch T_H17-Zellen [13] auf Verunreinigungen der Zellpopulation mit dendritischen Zellen zu beruhen [19]. Die Expression des IL-23-Rezeptors [18, 20] sowie von CCR6-Molekülen [20] charakterisiert T_H17-Zellen zusätzlich. Verschiedene Gruppen konnten bisher zeigen, dass eine Kombination von IL-6 und TGF β für die Differenzierung muriner naiver T_H0-Zellen in T_H17-Zellen essentiell ist [21-24]. In diesem Punkt ergibt sich ein entscheidender Unterschied zur T_H17-Differenzierung im humanen System. Hier ist die Kombination von TGF β und IL-6 nicht in der Lage, die T_H17-Differenzierung zu induzieren [25]. Vielmehr wirkt hier TGF β hemmend auf die T_H17-Differenzierung. Stattdessen wird für die Differenzierung humaner T_H17-Zellen eine Kombination von IL-1 β und IL-6 als wahrscheinlich angenommen [18, 25]. Bei der murinen Differenzierung der T_H17-Zellen induzieren STAT3 [26, 27] und IRF4 [28] gemeinsam die Expression des *retinoic acid related orphan receptor γ* (ROR γ t) [29], der für die Entwicklung der T_H17-Zellen erforderlich ist. Dagegen ist die Beteiligung von STAT3 und IRF4 im humanen System noch nicht beschrieben worden. IL-21 verstärkt über einen autokrinen positiven Rückkopplungsmechanismus die murine T_H17-Differenzierung sowie die vermehrte Bildung an T_H17-Zellen [15, 16]. Ein weiterer wichtiger Faktor in der T_H17-Differenzierung ist IL-23. Obwohl noch nicht geklärt ist, inwiefern IL-23 für die Differenzierung der T_H17-Zellen notwendig ist, spielt es dennoch eine essentielle Rolle bei der Expansion und dem Überleben der T_H17-Zellen [20]. Für eine ausgeglichene Regulation der T_H17-Differenzierung sind antagonistische Faktoren erforderlich. Hierbei wirken in Abhängigkeit der Spezies beispielsweise IL-4, IL-12 und IFN γ hemmend auf die T_H17-Differenzierung [11, 12]. Zusätzlich wurde gezeigt, dass IL-27 [30, 31], ebenfalls ein wichtiger Faktor in der T_H1-Differenzierung, sowie seine Untereinheit EBI3 [32] als potente Inhibitoren der murinen T_H17-Differenzierung agieren. Die wichtigsten Merkmale der

humanen sowie murinen T-Zelldifferenzierung sind in Abbildung 1.1 detailliert zusammengefasst.

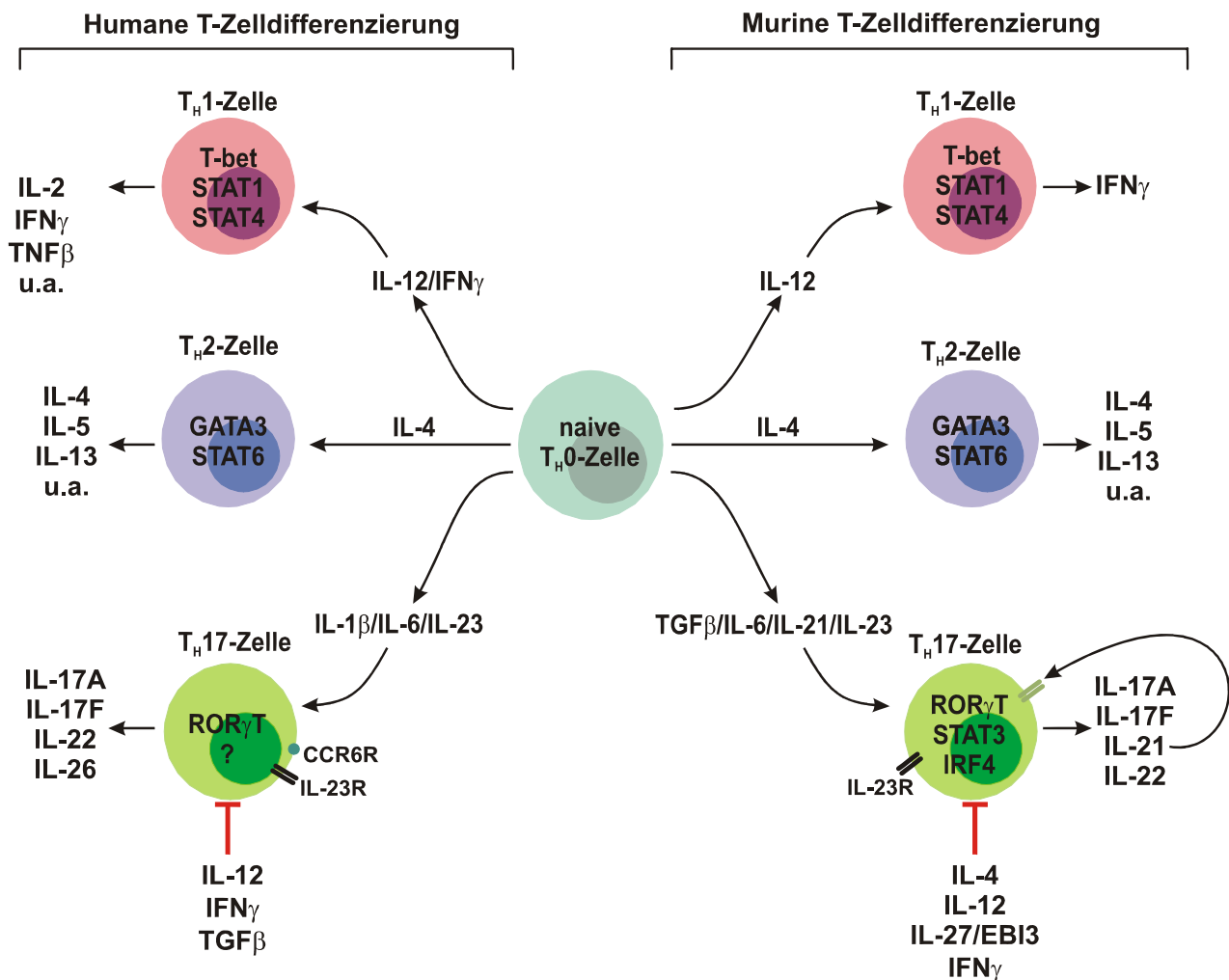


Abbildung 1.1 Unterschiede zwischen der humanen und murinen T-Zelldifferenzierung. (Modifiziert nach [33] mittels aktueller Literatur.)

T_H17-Zellen scheinen an der Immunabwehr gegen extrazelluläre Pathogene beteiligt zu sein und sind an der Pathogenese verschiedener Autoimmunerkrankungen involviert (siehe Kapitel 1.4). Im folgenden Abschnitt soll nun näher auf die Biologie des T_H17-Signaturzytokins IL-22 eingegangen werden.

1.2 Interleukin-22

Dumoutier et al. haben im Jahr 2000 erstmals ein sezerniertes, α -helikales Protein beschrieben, welches sie während einer Untersuchung zur differentiellen Genexpression in IL-9-stimulierten murinen T-Lymphomzellen entdeckt hatten [34]. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zum murinen IL-10 nannten sie dieses Protein *IL-10 related T cell derived inducible factor* (IL-TIF). Einige Monate später wurde das humane Ortholog nahezu zeitgleich von Dumoutier et al. [35] und Xie et al. [36] beschrieben. Beide Arbeitsgruppen wiesen eine Ähnlichkeit zum humanen IL-10 (23-25% Sequenzhomologie) nach und konnten die IL-10R2/CRF2-4 Rezeptorkette als Bestandteil des IL-TIF-Rezeptorkomplexes identifizieren. Daraufhin wurde es der IL-10-Familie zugeordnet und der Terminologie entsprechend in IL-22 umbenannt.

1.2.1 Die IL-10-Zytokinfamilie

Drei weitere strukturell verwandte Proteine wurden ohne nähere Kenntnisse über deren biologische Funktionen als Interleukine bezeichnet – IL-19, IL-20 und IL-26 [37-39]. Zusätzlich wurde ein bereits seit 1995 bekanntes Protein, das *melanoma differentiation associated gene 7* (mda-7), als Zytokin und Verwandter des IL-10 erkannt und in IL-24 umbenannt [40]. Dies war die Geburtsstunde der IL-10-Zytokinfamilie [41]. Heute zählen IL-10, IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26, IL-28 α , IL-28 β und IL-29 dazu. Die neuesten Mitglieder, IL-28 α , IL-28 β und IL-29, bilden eine theoretische Brücke zu den Typ I-Interferonen, da ihre Aminosäuresequenzen sehr hohe Ähnlichkeiten mit diesen aufweisen und ihre Aktivität in der intrazellulären viralen Abwehr mit den Typ I-Interferonen vergleichbar ist [42, 43].

Alle Mitglieder der IL-10-Zytokinfamilie vermitteln ihre biologischen Funktionen über heterodimere Rezeptorkomplexe, die aus einer Typ I (R1)- und einer Typ II (R2)-Rezeptorkette bestehen. Diese Ketten ähneln sich in ihrer extrazellulären Domäne und gehören zur Zytokinrezeptorfamilie der Klasse 2 (*cytokine receptor family 2*, CRF2), welche ebenfalls die Rezeptoren der Typ I- und Typ II-Interferone umfasst [44-46]. Abgesehen von strukturellen Gemeinsamkeiten scheinen die neuen Mitglieder der IL-10-Zytokinfamilie, und allen voran IL-22, kaum funktionelle Übereinstimmungen mit IL-10 aufzuweisen.

1.2.2 IL-22 ist ein T_H17- Zytokin

Die Expression der IL-22 mRNA wurde ursprünglich in IL-9-stimulierten murinen T-Lymphomzellen beschrieben [34]. Kurze Zeit später erfolgte der Nachweis der Expression von IL-22 in humanen T-Zellen des peripheren Blutes, welche mit anti-CD3-Antikörpern aktiviert wurden [33]. Weitere Untersuchungen an primären humanen Monozyten, B- und T-Lymphozyten sowie NK-Zellen zeigen, dass die IL-22-Expression auf aktivierte T-Zellen (anti-CD3) und aktivierte NK-Zellen (IL-2/IL-12) begrenzt ist [47, 48]. Unter den T-Zellsubpopulationen wurde IL-22 vorzugsweise in CD4⁺/CD45RO⁺ T-Zellen exprimiert. Weitere Studien implizieren, dass die Polarisation zum T_H1-Subtyp die Expression noch verstärkt. Dagegen konnte eine Expression von IL-22 in Makrophagen, dendritischen Zellen und Nicht-Immunzellen wie primären Gewebezellen und –zelllinien ausgeschlossen werden (siehe Kapitel 1.4.2) [49, 50].

Aktuelle Untersuchungen weisen dagegen darauf hin, dass T_H17-Zellen als Hauptproduzenten von IL-22 anzusehen sind. Liang et al. beschrieben 2006 erstmals sowohl *in vitro* als auch *in vivo* die Koexpression von IL-17A, IL-17F und IL-22 in murinen T_H17-Zellen [17]. Auch humane T_H17-Zellen sezernieren IL-17A, IL-17F und IL-22 [18, 51] (siehe Kapitel 1.1.2).

1.2.3 Der IL-22-Rezeptorkomplex vermittelt die Signaltransduktion des Zytokins

Der IL-22-Rezeptorkomplex ist ein Heterodimer bestehend aus den beiden Rezeptorketten IL-22R1 (CRF2-9) und IL-10R2 (CRF2-4) [35, 36, 52]. Beide Ketten zählen zur Zytokinrezeptorfamilie der Klasse II (CRF2) und ihre jeweiligen extrazellulären Domänen schließen zwei Fibronectin-Typ II-Domänen ein, welche für die Bindung des Zytokins notwendig sind [46]. Die längere intrazelluläre Domäne des IL-22R1 weist vier Tyr-X-X-Gln Motive auf, welche auf potentielle STAT-Bindestellen hinweisen [49]. Verschiedene Studien zeigen, dass natives IL-22 nicht an die IL-10R2-Kette binden kann [53-56]. Dies untermauert die Hypothese, dass die IL-22-Bindestelle für IL-10R2 Aminosäuresequenzen enthält, die normalerweise nicht auf der Oberfläche des Zytokins zugänglich sind und erst nach einer Konformationsänderung durch die initiale Bindung von IL-22 an die IL-22R1-Kette zugänglich werden [57].

IL-10R2 wird ubiquitär exprimiert, da es als Komponente verschiedener Zytokinrezeptoren Verwendung findet. Daher bestimmt die Expression der IL-22R1-Rezeptorkette die Responsivität einer Zelle für IL-22. Diverse Studien weisen auf eine fehlende Expression der IL-22R1-Kette im Knochenmark, in mononukleären Zellen des Blutes, im Tymus und in der Milz hin. Auch in ruhenden oder aktivierten primären Immunzellen wie Monozyten, B-Zellen, T-Zellen, NK-Zellen, Makrophagen, dendritischen Zellen und Mastzellen konnte keine IL-22R1-Expression nachgewiesen werden [44, 46, 47, 53]. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen wurde auch in korrespondierenden Zelllinien keine IL-22R-Expression gefunden. Stattdessen exprimieren diese Zellen aber die IL-10R2-Rezeptorkette [44, 53]. Im Gegensatz zu Immunzellen exprimieren vorwiegend epitheliale Zellen die IL-22R1-Rezeptorkette und bieten somit ein potentielles Ziel für die Wirkung von IL-22. Interessanterweise bildet die Mehrzahl der IL-22R1-exprimierenden Gewebe Barrieren und hat somit permanenten Kontakt zur Außenwelt. Hierzu zählen Haut, Niere, Dünndarm, Dickdarm, Lunge und Trachea [49, 58]. Zusätzlich ist die IL-22R1-Expression auch in Leber und Pankreas nachgewiesen [58]. Diesen Beobachtungen entsprechend wurden auch in korrespondierenden Zelllinien ähnliche Muster gefunden [46, 53]. Zusätzlich wurde auch in subepithelialen Myofibroblasten des Kolons [59] und in synovialen Fibroblasten [60] die IL-22R1-Expression gezeigt.

Neben der membranassoziierten IL-22R1-Rezeptorkette existiert noch eine weitere IL-22R2-Kette. Diese ist ein sezerniertes, lösliches Protein und wird auch als IL-22-Bindungsprotein (IL-22BP), als IL-22R α 2 oder als CRF2s1-short bezeichnet [61-63]. Das Protein entspricht der extrazellulären Domäne integraler CRF2-Membranrezeptoren, welchem sowohl die transmembranale als auch die intrazelluläre Domäne fehlt. IL-22BP bindet hochspezifisch an IL-22 und verhindert dadurch die Interaktion von IL-22 mit dem IL-22-Rezeptorkomplex und somit die biologische Aktivität von IL-22 [58-60]. Diese Beobachtungen implizieren, dass IL-22BP einen natürlichen Antagonisten von IL-22 bildet. Es fehlen aber gesicherte Untersuchungen, die dem Bindungsprotein eine definierte biologische Funktion zuordnen.

Es ist bekannt, dass Zytokine, welche an CRF2-Rezeptoren binden, ihre Signale primär über den JAK/STAT-Signalweg vermitteln. Für einen Großteil der Studien zur Signaltransduktion von IL-22 wurden Tumorzelllinien epithelialen Ursprungs verwendet, welche den IL-22-Rezeptorkomplex endogen exprimieren. Diese weisen nach Stimulation mit IL-22 eine dominierende Aktivierung von STAT3 und, in Abhängigkeit vom gewählten Zellsystem, auch von STAT1 und/oder STAT5 nach [34-36, 64-67]. Über die Aktivierung von

STAT3 kann IL-22 auch die Expression von *suppressor of cytokine signaling 3* (SOCS3) induzieren und reguliert so über einen negativen Rückkopplungsmechanismus seine eigene Signaltransduktion [68]. Lejeune et al. konnten weiterhin zeigen, dass die IL-22R1-Kette mit der *Janus kinase 1* (JAK1) assoziiert ist [65]. Dagegen ist die IL-10R2-Kette mit der *Tyrosine kinase 2* (Tyk2) verknüpft [69]. In Abbildung 1.2 wird die IL-22-vermittelte Aktivierung von STAT3 dargestellt.

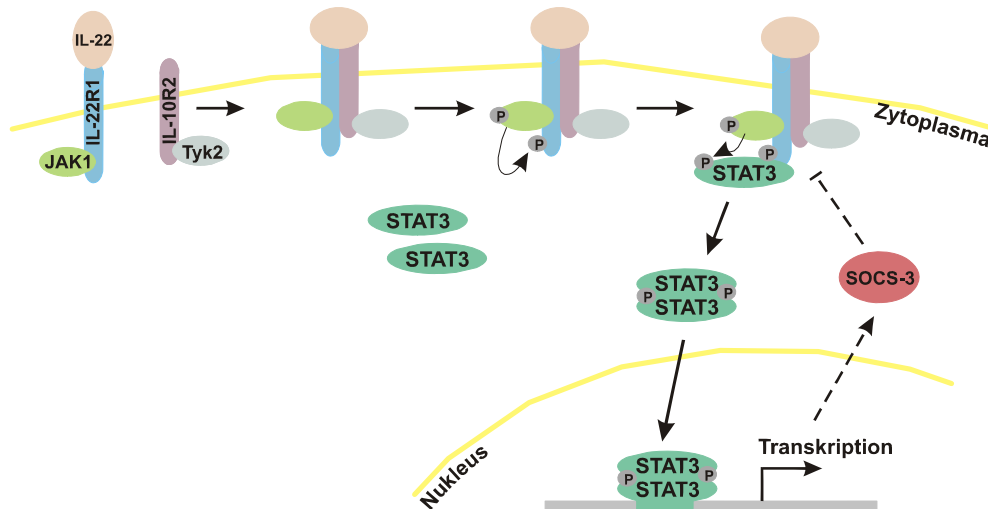


Abbildung 1.2 Schematische Darstellung der IL-22-vermittelten STAT3-Aktivierung. Die Bindung von IL-22 an die IL-22R1-Kette induziert eine Konformationsänderung innerhalb des Zytokins und gibt so die Bindungsstelle für die IL-10R2-Kette frei. Die anschließende Dimerisierung der beiden Rezeptorketten induziert die Aktivierung von JAK1. JAK1 phosphoryliert sich, die IL-22R1-Kette und die latent im Zytoplasma vorkommenden STAT3-Moleküle. Nachfolgend dimerisieren die phosphorylierten STAT3-Proteine, translokieren in den Nukleus und aktivieren die STAT3-abhängige Genexpression. Gleichzeitig kann IL-22 die Expression von SOCS3 induzieren und reguliert so über einen negativen Rückkopplungsmechanismus seine eigene Signaltransduktion.

Weitere wichtige Moleküle der IL-22-Signaltransduktion sind die *mitogen-activated protein kinases* (MAPK). Hierzu zählen *extracellular signal-related kinases* (ERK1/2), p38-Kinase und die *c-Jun N-terminal kinase* (JNK). Verschiedene Arbeitsgruppen konnten in Abhängigkeit des gewählten Zellsystems zusätzlich zur STAT3-Phosphorylierung die Aktivierung der Kinasen ERK1/2, p38, JNK sowie der Transkriptionsfaktoren *activating protein 1* (AP-1) und *nuclear factor κ B* (NF κ B) nachweisen [59, 60, 65].

1.3 IL-22 reguliert die Biologie epithelialer Zellen

Da die IL-10R2-Rezeptorkette ubiquitär exprimiert wird, bestimmt die Expression der IL-22R1-Rezeptorkette als limitierende Komponente die IL-22-Sensibilität der Zellen. Zu den IL-22-responsiven Zellen zählen beispielsweise Hepatozyten, Azinuszellen, Keratinozyten und intestinale Epithelzellen. Die Daten aus verschiedenen Studien mit Primärzellen sowie Zelllinien implizieren eine potentielle Rolle von IL-22 in der Immunabwehr, im Entzündungsgeschehen und bei der Wundheilung. Die Gruppen um Renauld und Gurney beschrieben die ersten Effekte von IL-22 in Leber- und Pankreaszellen. Insbesondere erschließen sich wichtige Funktionen dieses Zytokins aus Studien in Keratinozyten und intestinalen Epithelzellen. Dieser Abschnitt befasst sich daher im Speziellen mit den biologischen Effekten von IL-22 in Leber, Pankreas, Haut und Intestinaltrakt. Eine mögliche Rolle von IL-22 bei chronisch entzündlichen Autoimmunerkrankungen soll in Kapitel 1.4 näher besprochen werden.

1.3.1 Biologische Effekte von IL-22 in Leber und Pankreas

Bereits im Jahr 2000 wurde beschrieben, dass IL-22 die mRNA-Expression von **Serum-Amyloid A (SAA)**, α 1-Antichymotrypsin und Haptoglobin in der humanen HepG2 Hepatomzelllinie induziert [32]. Primäre humane Hepatozyten reagieren auf IL-22 gleichermaßen mit einer Induktion der SAA mRNA-Expression [49]. *In vivo* induziert die Injektion von IL-22 ebenfalls eine erhöhte SAA mRNA-Expression in der Leber endotoxinresistenter C3H/HEJ-Mäuse [32]. Später wurde in BALB/c-Mäusen die SAA-Expression auch auf Proteinebene bestätigt [49]. SAA, α 1-Antichymotrypsin und Haptoglobin werden zur Gruppe der Akut-Phase-Proteine gerechnet. Diese zählen zur angeborenen Immunität und dienen unter anderem der Lokalisierung der Infektion. Dabei verhindern sie die Ausbreitung und unterstützen das Immunsystem bei der Sanierung des Entzündungsherdes. α 1-Antichymotrypsin wirkt den vermehrt freigesetzten Proteasen entgegen und reduziert so die Gewebeschädigung. Dagegen induziert SAA die Leukozytenadhäsion und die Bildung proinflammatorischer Zytokine. Haptoglobin bindet freies Hämoglobin und entfernt es vom Entzündungsherd.

Im exokrinen Pankreas induziert IL-22 die Expression des **Pankreas-assoziierten Proteins 1 (PAP1)**. Dies wurde in murinen primären Azinuszellen des Pankreas *in vitro* nachgewie-

sen [64]. PAP1 ist ein Zytokin-ähnliches Protein und wird vermehrt bei entzündlichen Erkrankungen wie der Pankreatitis exprimiert. Es übernimmt eine wichtige Rolle beim Schutz vor Gewebeschädigungen und verstärkt die Leberregeneration nach einer partiellen Hepatektomie oder schützt vor einer Natriumtaurocholat-induzierten akuten Pankreatitis [57].

1.3.2 Biologische Effekte von IL-22 in der Haut

Eine Vielzahl der Untersuchungen zur Biologie von IL-22 wurde in humanen Keratinozyten durchgeführt. Daher sind die IL-22-vermittelten Effekte hier außerordentlich gut charakterisiert. Zwei voneinander unabhängige Studien identifizierten ein weites Spektrum an IL-22-induzierten Genen [48, 70]. Hierfür verwendeten die beiden Arbeitsgruppen zwei verschiedene Genexpressionsanalysen, welche für Keratinozyten-spezifische Gene konzipiert waren. Die induzierten Gene können in drei funktionelle Kategorien eingeteilt werden: (i) IL-22 verstärkt die Expression antimikrobieller Proteine, (ii) IL-22 reduziert die Expression differenzierungs-assoziiierter Proteine und (iii) IL-22 reguliert die Expression von mobilitäts- und migrations-regulierenden Proteinen.

Zur ersten Gruppe zählen die humanen β -Defensine 2 und 3 (hBD) sowie S100A7 (Psoriasin), S100A8 (Calgranulin A) und S100A9 (Calgranulin B). Die hBD sind kleine Moleküle und können sowohl Bakterien als auch Viren und Pilze durch die Destabilisierung ihrer Membranen zerstören. Sie werden hauptsächlich in der Haut und mukösen Epithelien exprimiert und bilden dort eine Barriere gegen mikrobielle Infektionen [71]. S100A7, S100A8 und S100A9 gehören zur Kalzium-bindenden S100-Familie und sie schützen die Haut vor dem Eindringen von Mikroorganismen. Für Psoriasin wurde im Speziellen ein Zink-Ionenentzug nachgewiesen, der vor allem Schutz vor Infektionen mit *E. coli* bietet [72]. Die Induktion unterschiedlicher Schutzmechanismen weist darauf hin, dass IL-22 Pathogene sehr effizient eliminieren kann und somit ein wichtiger Mitspieler in der antimikrobiellen Abwehr der Epidermis ist.

Profilagrin, Keratin 1, Keratin 10, Calmodulin-like 5, *keratinocyte differentiation-associated protein* und Kallikrein 7 werden der zweiten Gruppe IL-22-regulierter Gene zugeordnet. Diese Proteine sind an der terminalen Keratinozytendifferenzierung beteiligt, wobei es sich um einen speziellen apoptotischen Prozess handelt, welcher in der Ausbildung des mechanisch resistenten *Stratum corneum* resultiert.

Die letzte Gruppe IL-22-sensitiver Gene reguliert die zelluläre Mobilität. IL-22 verstärkt die Expression der **Matrixmetalloproteasen** (MMP) 1 sowie 3 und reduziert die Expression von Desmocollin 1 und Annexin A9. MMP1 wird für die initiale Keratinozytenmigration benötigt und MMP3 baut alte multizelluläre Aktinnetzwerke ab und spielt dabei eine wichtige Rolle bei der Wundkontraktion.

1.3.3 Biologische Effekte von IL-22 im Intestinaltrakt

Intestinale Epithelzellen (*intestinal epithelial cells*; IEC) bilden eine physikalische Barriere, die eine Antigenpräsentation fremder Proteine mit einer sich anschließenden Immunantwort vermeidet. Die apikale Seite der IEC ist permanent einer Vielzahl fremder Antigene im Darmlumen ausgesetzt, da sich im Intestinaltrakt annähernd 10^{12} Organismen in einem Milliliter Faeces befinden. Eine wichtige Funktion der IEC ist die aktive Erhaltung der immunologischen Toleranz gegenüber nicht-pathogenen Antigenen kommensaler Bakterien. Parallel dazu können sie aber auch eine Immunantwort induzieren, sollten potentiell pathogene Mikroorganismen erkannt werden. Bei entzündlichen Darmerkrankungen wird die Verteidigungslinie der IEC durchbrochen. Dies führt zu einer unkontrollierten Immunantwort, die im Besonderen in Abwesenheit nachweisbarer Pathogene auch gegen nicht-pathogene kommensale Bakterien gerichtet sein kann.

Neben den in der vorliegenden Arbeit vorwiegend untersuchten DLD-1 Zellen exprimieren noch weitere intestinale Epithelzellen die beiden Rezeptorketten des IL-22-Rezeptorkomplexes [66, 73]. Die Stimulation von HT-29 Zellen resultiert in der Aktivierung von STAT1, STAT3, ERK1/2, PKB/Akt und JNK [72]. Diese Studie zeigt ebenfalls eine erhöhte Zellproliferation und Migration nach IL-22-Stimulation sowie eine vermehrte mRNA-Expression von $\text{TNF}\alpha$, IL-8 und hBD2. Nagalakshmi et al. verwenden Colo205 Zellen und weisen hier neben der IL-22-vermittelten Aktivierung von STAT1, STAT3 und SOCS3 auch die Induktion der Akut-Phase-Proteine α 1-Antichymotrypsin und SAA nach. Zusätzlich ist eine verstärkte IL-10-Expression sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene zu beobachten [66]. Die Induktion von α 1-Antichymotrypsin, SAA und IL-10 kann durch Vorinkubation der Zellen mit einem neutralisierenden Antikörper gegen IL-10R2 bzw. mit IL-22BP gehemmt werden, wodurch die Spezifität der IL-22-induzierten Genexpression belegt wird.

In Anlehnung an die Studien in Keratinozyten verwendeten Andoh et al. einen cDNA-Microarray, um mögliche Effekte von IL-22 hinsichtlich der Genexpression in humanen

subepithelialen intestinalen Myofibroblasten zu bestimmen [56]. Es ist bekannt, dass diese Zellen sowohl die Migration als auch die Proliferation intestinaler Epithelzellen im Rahmen wichtiger Reparaturmechanismen des Darms stimulieren. Die IL-22-induzierten Gene können auch hier in drei Gruppen unterteilt werden. Zur ersten Gruppe zählen Proteine, welche die Entzündungsantwort regulatorisch beeinflussen. Hierzu gehören sowohl proinflammatorische Chemokine (CCL7, CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL6 und CXCL8) als auch antiinflammatorische Proteine wie Follistatin und IL-11. Follistatin ist ein natürlicher Antagonist des Activins, welches in entzündeten Segmenten des Darms bei *Colitis ulcerosa* und *Morbus Crohn* verstärkt exprimiert wird [74]. IL-11 schützt die Mukosa bei entzündlichen Darmerkrankungen [75]. Die zweite Gruppe umfasst Matrixmetalloproteasen (MMP1, MMP3 und MMP9). Die dritte Gruppe besteht aus Mediatoren, welche die Proliferation der Epithelzellen reguliert. Dazu zählen Amphiregulin und der *leukaemia inhibitory factor* (LIF). Amphiregulin ist ein Mitglied der *epidermal growth factor receptor* (EGFR)-Familie und fördert das Wachstum der Epithelzellen. LIF steuert ebenfalls die Proliferation der Enterozyten und hemmt die Expression von Differenzierungsmarkern.

1.4 Die Funktion von IL-22 in der Immunantwort

1.4.1 Die Rolle von IL-22 bei Autoimmunerkrankungen

Prinzipiell ist eine geregelte Immunantwort hinsichtlich der Vermeidung entzündlicher Erkrankungen essentiell. Hier soll daher auch auf eine mögliche Rolle von IL-22 bei chronisch entzündlichen Autoimmunerkrankungen eingegangen werden.

Psoriasis

Bis 2007 wurde allgemein angenommen, dass die Psoriasis ein T_H1 -vermitteltes Krankheitsbild darstellt [76]. In der aktuellen Literatur wird nun aber vermehrt davon ausgegangen, dass die erst kürzlich beschriebenen T_H17 -Zellen bei der Pathogenese der Psoriasis eine Schlüsselrolle übernehmen [76, 77]. Verschiedene Arbeitsgruppen weisen eine massiv erhöhte Expression von IL-22 sowohl auf mRNA- (in Hautläsionen) als auch auf Proteinebene (im Serum/Plasma) bei Psoriasispatienten nach, wohingegen IL-22 in gesunden Donoren praktisch nicht detektierbar ist [48, 49, 56, 77, 78]. Analysen zeigen dabei eine positive Korrelation zwischen der IL-22-Konzentration im Plasma und dem

Schweregrad der Psoriasis [45]. In den betroffenen Hautläsionen wurde neben der vermehrten IL-22 mRNA-Expression ebenfalls eine stark erhöhte Expression der IL-22-induzierten Gene hBD2/3, S100A7, S100A8, S100A9 sowie MMP1 nachgewiesen, welche mit der kutanen Expression von IL-22 korrelieren [45, 46, 77]. Die Therapie der Psoriasis mit Cyclosporin A [77, 79], Etanercept (TNF α -Rezeptor-Ig-Fusionsprotein) [80] oder mit anderen kombinierten Therapeutika (Phototherapie, Dithranol, Teersalben, Calcipotriol, Fumarsäureester und Cyclosporin A) [45] kann sowohl die kutane IL-22 mRNA-Expression als auch die IL-22-Konzentration im Blut signifikant reduzieren. Diese Daten weisen in ihrer Gesamtheit darauf hin, dass IL-22 an der Entwicklung und/oder der Erhaltung der Pathogenese der Psoriasis beteiligt ist.

Kürzliche Publikationen weisen IL-23 eine mögliche Funktion in der Pathogenese der Psoriasis zu [81, 82]. IL-23 wirkt primär auf Immunzellen [83] und ist an der Entwicklung der T_H17-Zellen beteiligt (siehe Kapitel 1.1.2). Daher gilt das T_H17-Signaturzytokin IL-22 als potentieller Vermittler zwischen infiltrierenden Immunzellen, allen voran T-Lymphozyten, und den Keratinozyten in den betroffenen Hautläsionen der Psoriasis. Zheng et al. demonstrieren sehr deutlich, dass eine Injektion von IL-23 in C57Bl/6 Wildtyp-Mäusen einen entzündlichen Hautphänotyp induziert, welcher durch die Infiltration von Leukozyten und einer epidermalen Hyperplasie (Akanthose) charakterisiert ist [84]. Die infiltrierenden CD4⁺ T-Zellen weisen einen T_H17-Phänotyp auf und sowohl IL-17 als auch IL-22 sind nachweisbar. Dagegen können die pathologischen Merkmale in IL-22-defizienten Mäusen eindrucksvoll minimiert werden. In Übereinstimmung mit diesen Beobachtungen verbessert die Verabreichung eines IL-22-spezifischen Antikörpers die entzündliche Hauterkrankung in einem murinen Modell der Psoriasis [85]. Auch diese Daten unterstützen eine potentiell pathologische Funktion von IL-22 in der Psoriasis.

Chronisch entzündliche Darmerkrankungen

Unter den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen werden die Krankheitsbilder *Morbus Crohn* und *Colitis ulcerosa* zusammengefasst. Beide Erkrankungen weisen Gemeinsamkeiten bezüglich Genese, Krankheitsverlauf, Diagnostik und Therapie auf, allerdings besteht auch eine Reihe wesentlicher Unterschiede. Der Auslöser kann unter anderem eine „irrtümliche“ Immunreaktion auf nicht-pathogene kommensale Mikroorganismen sein, welche normalerweise für das Gleichgewicht einer stabilen Darmflora sorgen. Die Aktivierung der angeborenen Immunität könnte beispielsweise über eine verstärkte TLR-Aktivität erfolgen. Anschließend induzieren die hierdurch aktivierten

dendritischen Zellen die Differenzierung naiver T-Zellen. Dabei gilt, dass *Morbus Crohn* offenbar vorwiegend ein T_H1 -/ T_H17 -vermittelter Prozess ist, wohingegen die Pathogenese der *Colitis ulcerosa* primär über T_H2 - und NK-Zellen verläuft [86-88]. Verschiedene Arbeitsgruppen zeigen, dass sowohl bei *Morbus Crohn* als auch bei *Colitis ulcerosa* die IL-22 mRNA-Expression im Vergleich zu nicht-entzündetem Gewebe massiv erhöht ist, wobei die durchschnittliche IL-22-Konzentration im entzündeten Gewebe bei Patienten mit *Colitis ulcerosa* geringer ist als bei *Morbus Crohn* [59, 73, 89]. Bei *Morbus Crohn* korreliert die IL-22-Konzentration im Serum mit dem Schweregrad der Erkrankung [90, 91]. Brand et al. weisen zusätzlich eine positive Korrelation zwischen der IL-22 mRNA-Expression und der IL-8 mRNA nach. Auch in diversen Mausmodellen für chronisch entzündliche Darmerkrankungen wurde eine gesteigerte IL-22-Expression gezeigt [73, 90, 92].

Aktuelle Studien beschreiben eine Assoziation von IL-23 mit der Pathogenese des *Morbus Crohn*. Elson et al. zeigen, dass ein monoklonaler α IL-23-Antikörper einer murinen T_H1 -vermittelten Kolitis vorbeugt sowie eine aktive Kolitis therapiert [93]. Interessanterweise scheinen verschiedene Genvarianten des IL-23-Rezeptors (IL-23R) beim Menschen die Serumkonzentration an IL-22 zu beeinflussen [91]. IL-22 wird bei Trägern der IL-23R-Allele, welche mit einem erhöhten *Morbus Crohn*-Risiko verbunden sind, vergleichsweise vermehrt sezerniert als bei Trägern der IL-23R-Allele, welche mit einem verminderten *Morbus Crohn*-Risiko assoziiert werden. Dies ist als deutlicher Hinweis auf die pathologische Funktion von IL-22 bei *Morbus Crohn* zu werten.

In zwei murinen Modellen des *Morbus Crohn* stimuliert IL-22 *in vivo* die Expression von LY6A und LY6C auf der Zelloberfläche intestinaler Epithelzellen, was in einer vermehrten Chemokinsekretion resultiert [94]. In gesunden Kontrolltieren kann dieser Effekt dagegen nicht nachgewiesen werden. Obwohl die Mitglieder der LY6-Familie als Differenzierungsmarker für Immunzellen verwendet werden [95], ist die genaue Funktion noch unklar. Einige Publikationen zeigen, dass LY6-Proteine sowohl an der T-Zellaktivierung [96, 97] als auch an der Zelladhäsion [98] beteiligt sind. Auch die Resultate dieser Studien implizieren eine potentiell pathologische Funktion von IL-22 bei *Morbus Crohn*.

Im Gegensatz dazu wurden kürzlich auch protektive Effekte von IL-22 vorgestellt. IL-22 stimuliert *in vivo* die Produktion des LPS-Bindungsproteins (LBP), welches auch im Blut von *Morbus Crohn*-Patienten erhöht ist [90, 99]. Es wird postuliert, dass IL-22 auf diese Weise zur Prävention einer systemischen Entzündung beiträgt, welche durch das vorhandene LPS im Blut von *Morbus Crohn*-Patienten verursacht wird. Diese Vermutung geht einher mit neuesten Befunden in einem T_H2 -vermittelten murinen Kolitis-Modell,

welches ein der *Colitis ulcerosa* ähnelndes Krankheitsbild widerspiegelt [88]. Die hier verwendete lokale Injektion muriner IL-22-cDNA stimuliert nach Expression des Zytokins die Aktivierung von STAT3 speziell in intestinalen Epithelzellen und induziert sowohl die Expression der Mukosa-assoziierten Proteine MUC-1, -3, -10 und -13 (Muzine) als auch die Migration Muzin-bildender Becherzellen im Darmepithel. Ein wichtiger Befund dieser Studie ist die eindrucksvolle Verbesserung der lokalen intestinalen Entzündung aufgrund vermehrter Muzinproduktion.

Rheumatoide Arthritis

Die **Rheumatoide Arthritis** (RA) ist eine chronisch entzündliche Erkrankung, welche progressive Gelenkschäden und eine daraus resultierende Gelenkversteifung verursacht. Das rheumatoide Synovium ist durch die Infiltration entzündlicher mononukleärer Zellen wie T-Zellen und Makrophagen sowie durch die Proliferation synovialer Fibroblasten charakterisiert. Inflammatorische Zytokine wie $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ und IL-6 spielen eine zentrale Rolle in der Entwicklung einer Synovitis [100]. Die Neutralisation dieser Zytokine wird bereits als effiziente Therapiemaßnahme klinisch angewendet.

Aktuelle Untersuchungen zeigen, dass auch IL-22 im Synovium von RA-Patienten nachgewiesen werden kann. Zusätzlich fördert IL-22 sowohl die Proliferation als auch die Chemokinsekretion synovialer Fibroblasten [57]. Ergänzend zu dieser proentzündlichen Funktion wird beschrieben, dass IL-22-sezernierende $\text{T}_{\text{H}}17$ -Zellen zur Pathogenese der juvenilen idiopathischen Arthritis beitragen [101]. In der Literatur fehlen aber noch detaillierte Untersuchungen zur Rolle von IL-22 in präklinischen Arthritismodellen. Daher ist eine Aussage über das therapeutische Potential von IL-22 in der RA nicht möglich.

Experimentelle Autoimmunenzephalitis (EAE)

Die **experimentelle Autoimmunenzephalitis** (EAE) ist ein etabliertes Mausmodell für Untersuchungen der humanen Multiplen Sklerose. Kürzlich ist beschrieben worden, dass IL-23-induzierte $\text{T}_{\text{H}}17$ -Zellen weitaus pathogener in EAE-Modellen sind als IL-12-induzierte $\text{T}_{\text{H}}1$ -Zellen [13]. Eine aktuelle Studie zeigt, dass IL-17- und IL-22-exprimierende humane $\text{T}_{\text{H}}17$ -Zellen die Blut-Hirn-Schranke effizient überschreiten können. Tatsächlich fördern sowohl IL-17 als auch IL-22 die Permeabilisierung der Blut-Hirn-Schranke hinsichtlich löslicher Moleküle (Granzym B) als auch zirkulierender CD4^+ T-Zellen [102]. Dennoch reagieren IL-22-defiziente Mäuse sehr empfindlich auf eine induzierte EAE, was darauf hinweist, dass IL-22 nicht an der Pathogenese der EAE beteiligt ist [103].

ConA-induzierte Hepatitis

Für die Charakterisierung der Pathogenese einer Hepatitis wird häufig das Modell der Concanavalin (ConA)-induzierten murinen Hepatitis verwendet. Dieses Modell ist mit einer massiven Infiltration aktivierter T-Zellen und einer daraus resultierenden signifikant erhöhten IL-22-Expression assoziiert. Um die Funktion von IL-22 in diesem Modell näher zu untersuchen, wurden durch verschiedene Arbeitsgruppen unterschiedliche Vorgehensweisen gewählt. Die Injektion eines neutralisierenden monoklonalen α IL-22-Antikörpers verstärkt den Leberschaden in diesem Modell [104, 105], wohingegen eine präventive Verabreichung von rekombinantem IL-22 [104] oder eine transiente Überexpression von IL-22 [105] dem ConA-induzierten Leberschaden vorbeugt. Diese Studie impliziert, dass IL-22 wichtig für das Überleben von Hepatozyten ist. Diese Vermutung wird durch die anti-apoptotischen und mitogenen Effekte des rekombinanten IL-22 unterstrichen, welche in humanen HepG2-Zellen beschrieben worden sind [104]. Die protektive Rolle von IL-22 kann auch bei akutem Leberschaden in IL-22-defizienten Mäusen bestätigt werden [106]. Diese Tiere sind extrem anfällig für einen Leberschaden nach ConA-induzierter Hepatitis und die präventive Injektion von IL-22-exprimierenden T_H17-Zellen, nicht aber von IL-22-defizienten T_H17-Zellen, schützt vor den destruktiven Effekten der aktivierten T-Zellen während der Hepatitis.

1.4.2 Die Rolle von IL-22 bei Infektionen

Die Induktion verschiedener antimikrobieller Peptide in unterschiedlichen Zelltypen lässt vermuten, dass IL-22 bei der Immunabwehr pathogener Mikroorganismen eine Rolle spielt.

Individuen, welche trotz wiederholter Exposition resistent gegenüber einer HIV-Infektion sind, weisen eine deutlich erhöhte IL-22-Produktion ihrer aktivierten T-Zellen verglichen mit HIV-positiven Patienten oder gesunden Kontrollpersonen auf [107]. In den wiederholt HIV-exponierten nicht-infizierten Individuen kann ein Serumamyloid A-Spaltprodukt im Serum nachgewiesen werden. Dieses vermittelt in *in vitro*-generierten unreifen dendritischen Zellen über die Bindung an einen G α_i -Protein-gekoppelten Rezeptor die Internalisierung/Desensibilisierung des CCR5-Rezeptors. Die so verminderte CCR5-Expression reduziert massiv die Sensibilität der Zellen gegenüber einer *in vitro*-Infektion mit HIV. CCR5 ist als Korezeptor für HIV-1 essentiell für die Infektion CD4⁺ T-Zellen und eine

Mutation im CCR5-Gen ist assoziiert mit einem relativen Schutz vor einer HIV-Infektion [108]. Eine weitere Studie identifiziert IL-22 als Kandidat bei der Kontrolle der Mortalität während einer *Theiler's murine encephalomyelitis virus*-Infektion [109]. Diese Studien unterstützen die Annahme, dass IL-22 an der Kontrolle viraler Infektionen beteiligt ist.

Verschiedene Arbeitsgruppen zeigen, dass T_H17-Zellen neben ihrer Rolle in der Autoimmunität eine Schlüsselfunktion bei der mukösen Immunabwehr gegen extrazelluläre Pathogene besitzen (siehe Kapitel 1.1.2). In zwei aktuellen Publikationen wird der Einfluss von IL-22 in etablierten Mausmodellen der bakteriellen Infektion näher charakterisiert. Aujla et al. untersuchten die Rolle von T_H17-Zellen in einem *Klebsiella pneumoniae*-induzierten murinen Pneumoniemodell [110]. Sie zeigen, dass IL-23 für die IL-22-Produktion in T_H17-Zellen essentiell ist. Sowohl IL-22 als auch IL-17A wird von T_H17-Zellen sezerniert und sind entscheidend für die Immunabwehr bei bakteriellen Infektionen. Beide Zytokine beeinflussen die epitheliale Produktion verschiedener Chemokine (CXCL1, CXCL5, CXCL9) und antibakterieller Peptide (hBD2, Psoriasin, Calgranulin C, Lipocalin-2) positiv. Jedoch vermag nur IL-22 die Proliferation der Lungenepithelzellen sowie den transepithelialen Widerstand mit einer damit assoziierten Verminderung translozierender intestinaler Keime zu erhöhen, um so der *K. pneumoniae*-induzierten Zellschädigung entgegenzuwirken.

Zheng et al. verwenden die Infektion mit *Citrobacter rodentium* als Mausmodell einer humanen *Escherichia coli*-induzierten Enterokolitis durch enterohämorrhagische (EHEC) oder enteropathogene (EPEC) *E. coli* [111]. Die Anhaftung der Pathogene an die Kolon-epithelzellen resultiert in der Zerstörung der Mikrovilli des intestinalen Bürstensaums und in einer Hyperplasie der Mukosa. Dieses Modell zeigt, dass IL-22 eine entscheidende Rolle in der frühen Phase der Immunabwehr gegen *C. rodentium* spielt. Die Infektion führt in IL-22-defizienten Mäusen sowohl zu einer verstärkten epithelialen Zellschädigung als auch zu einer vermehrt systemischen Infektion mit erhöhter Mortalität. Auch diese Arbeit verdeutlicht, dass IL-23 für die frühe Induktion von IL-22 erforderlich ist. Entgegen bisherigen Annahmen werden hier unter Verwendung von Rag2-defizienten Mäusen, welche keine T- und B-Zellen ausbilden können, dendritische Zellen als zusätzliche Quelle für IL-22 beschrieben (siehe Kapitel 1.2.2). Diese ermöglichen lymphopenischen Mäusen, einer Infektion mit *C. rodentium* standzuhalten und sie sogar in Abwesenheit der adaptiven Immunität zu eliminieren. IL-22 vermittelt dabei die Aktivierung intestinaler Epithelzellen mit Expression antimikrobieller Peptide der Reg-Familie (RegIII β und RegIII γ) und zeigt so eine zentrale und T-Zell-unabhängige Funktion im Rahmen der angeborenen Immunität.

Entsprechend verbessert die Injektion von RegIII γ die Überlebenschancen IL-22-defizienter Mäuse nach *C. rodentium*-Infektion wesentlich.

1.5 Die induzierbare NO-Synthase (iNOS) fördert chronische Entzündungen und die Karzinogenese an Epithelien

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein hochreaktives, kurzlebiges Radikal, welches frei diffundieren kann. 1987 wurde erstmals beschrieben, dass NO als *endothelium-derived relaxation factor* (EDRF), vom Gefäßendothel synthetisiert und freigesetzt, eine Dilation der glatten Gefäßmuskulatur via cGMP bewirkt [112, 113]. Darüber hinaus kann das Signalmolekül NO direkt das Genexpressionsprofil von Zellen beeinflussen und vermittelt so eine Vielzahl an Wirkungen, die sich in Abhängigkeit vom Typ der NO-Synthase und ihrer Gewebelokalisation unterscheiden. Neben zentralen physiologischen Funktionen bei Vasodilation und Thrombozytenaggregation ist es ein essentielles Molekül in der Neurotransmission, es greift in den Eisenstoffwechsel ein und ist wichtig bei der Immunabwehr [114]. Es verstärken sich allerdings Hinweise, die einer latent erhöhten NO-Produktion im Rahmen einer chronischen Entzündung einen Beitrag zur Entstehung von Tumoren zuweisen (siehe Kapitel 1.5.3.2) [115-118].

1.5.1 Stickstoffmonoxid-Synthasen

In Säugetieren existieren drei eigenständige Isoformen der NO-Synthase. Für die NO-Synthese benötigen sie sowohl das Substrat L-Arginin als auch verschiedene Kofaktoren bzw. Koenzyme wie NADPH, BH₄, FAD, FMN, Sauerstoff und Protoporphyrin IX [119]. Die katalytische Reaktion verläuft in zwei getrennten Schritten. Zunächst wird L-Arginin mittels O₂ und NADPH hydroxyliert und es entsteht *N*- ω -hydroxy-L-arginin [120]. Dies wird anschließend oxidiert und ergibt L-Citrullin und NO. Zusätzlich können die drei Isoformen insbesondere bei Mangel an Kofaktoren Superoxid bilden, welches mit NO zu Peroxynitrit reagiert [121].

Die Isoformen der NO-Synthase unterscheiden sich hinsichtlich der Gewebespezifität, der Ca²⁺-Abhängigkeit und der Menge an gebildetem NO. Die neuronale NOS (n/bNOS; NOS1) wird hauptsächlich in Neuronen exprimiert, wohingegen die endotheliale NOS

(eNOS; NOS3) primär im Endothel vorkommt. Sowohl die nNOS als auch die eNOS sind Ca^{2+} -abhängig und werden konstitutiv exprimiert. Ihre Aktivierung resultiert in einer pulsartigen Produktion niedriger NO-Konzentrationen (pM bis nM) mit kurzer Halbwertszeit [114]. Die Expression der induzierbaren NOS (iNOS; NOS2) wurde in einer Vielzahl an Zellen beschrieben. Hierzu zählen Makrophagen [122], Chondrozyten [123], Kupfferzellen, Hepatozyten [124, 125], renale Mesangiumzellen [126, 127], neutrophile Granulozyten [128], Lungenepithelzellen [129] und Kolonepithelzellen [130]. Generell scheinen im humanen System speziell Hepatozyten und Zellen epithelialen Ursprungs die iNOS zu exprimieren [131-133], wobei die Expression der iNOS in einer Mehrheit der humanen Zellen die Induktion durch eine komplexe Kombination proinflammatorischer Zytokine ($\text{IL-1}\beta$, $\text{TNF}\alpha$, $\text{IFN}\gamma$) [125, 134, 135] oder durch Hypoxie [136] erfordert. Dagegen kann die Expression der iNOS in Nagerzellen (Maus und Ratte) auch durch Einzelstimuli proinflammatorischer Zytokine wie $\text{IL-1}\beta$ [137], $\text{TNF}\alpha$ [138, 139] oder $\text{IFN}\gamma$ [138, 139] sowie durch bakterielles Lipopolysaccharid (LPS) [140, 141] induziert werden. Im Allgemeinen ist die Aktivierung der iNOS-Expression Ca^{2+} -unabhängig und führt kontinuierlich zu einer massiven NO-Produktion (μM), welche über einen längeren Zeitraum andauern kann [122].

1.5.2 Regulation der iNOS-Expression

Die Signalwege, welche die iNOS-Expression regulieren, variieren sowohl in verschiedenen Zellarten als auch in unterschiedlichen Spezies. Die Expression der iNOS wird hauptsächlich über transkriptionelle Mechanismen reguliert.

Hierbei spielt der Transkriptionsfaktor $\text{NF}\kappa\text{B}$ eine zentrale Rolle. LPS, $\text{IL-1}\beta$, $\text{TNF}\alpha$ und oxidativer Stress können in verschiedenen Zelltypen durch Aktivierung von $\text{NF}\kappa\text{B}$ die iNOS-Expression induzieren. Eine wichtige Funktion von $\text{NF}\kappa\text{B}$ für die Induktion der iNOS-Promotoraktivität konnte in murinen Zellen [141-143], Rattenzellen [127] und humanen Zellen [144, 145] nachgewiesen werden. Bezüglich $\text{NF}\kappa\text{B}$ spiegelt sich in DLD-1 Zellen, welche in der vorliegenden Arbeit primär Verwendung fanden, allerdings ein etwas anderes Bild wider. DLD-1 Zellen weisen eine hohe Basalaktivität an $\text{NF}\kappa\text{B}$ auf, welche nur graduell durch $\text{IFN}\gamma/\text{IL-1}\beta/\text{TNF}\alpha$ verstärkt wird [146]. Daher wird in DLD-1 Zellen für $\text{NF}\kappa\text{B}$ die Rolle eines „basalen“ Transkriptionsfaktors angenommen.

Ebenfalls enthält der iNOS-Promotor eine Bindungsstelle für den IFN γ -regulierten Transkriptionsfaktor STAT1 α . Eine Exposition von Zellen mit IFN γ resultiert in der Aktivierung von JAK2-Molekülen. Diese Kinase phosphoryliert unter anderem die latent im Zytoplasma vorkommenden STAT1 α -Moleküle. Anschließend dimerisieren die phosphorylierten STAT1 α -Proteine, translozieren in den Nukleus und aktivieren die STAT1 α -abhängige iNOS-Expression durch Bindung an die GAS-Elemente (*γ activated sites*) [147]. Eine essentielle Beteiligung des IFN γ -JAK2-STAT1 α -Signalweges bei der iNOS-Induktion wurde in murinen Zellen [148-151], Rattenzellen [152, 153] und humanen Zellen [146, 154, 155] nachgewiesen. Im humanen iNOS-Promotor ist dem entsprechend ein bifunktionelles NF κ B/STAT1 α -Motiv bei -5,8kb sowie ein STAT1 α -spezifisches responsives Element bei -5,2kb identifiziert worden [155].

Ein dritter wichtiger Transkriptionsfaktor reguliert unter anderem die Transkription IFN γ -induzierbarer Gene. Daher wird er nach seiner Funktion als *Interferon regulatory factor-1* (IRF-1) bezeichnet. Bekanntermaßen ist IRF-1 an der Regulation der murinen sowie humanen iNOS-Induktion beteiligt [131].

Der intrazelluläre Spiegel an cAMP ist ein weiterer Regulationsmechanismus der iNOS-Expression. Sowohl in renalen Mesangiumzellen [156] als auch in DLD-1 Zellen [157] ist nachgewiesen worden, dass eine erhöhte intrazelluläre cAMP-Konzentration eine potente Induktion der iNOS-Expression vermittelt.

Im Gegensatz zur Aktivierung von NF κ B und dem IFN γ -JAK2-STAT1 α -Signalweg, welche die iNOS-Expression fördern, hemmt die Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 die Induktion der iNOS-Expression. Im Speziellen wurde dies an humanen DLD-1 Zellen sowie an humanen A549/8 Alveolarepithelzellen nachgewiesen [146, 158].

Da in der überwiegenden Anzahl an *in vitro*-Studien ausschließlich die Kombination multipler Zytokine eine profunde iNOS-Expression vermittelt, ist anzunehmen, dass die Induktion mehrerer Signaltransduktionswege für eine vollständige iNOS-Expression essentiell ist.

Im humanen System treten markante Unterschiede zwischen der Promotoraktivität und der iNOS mRNA-Expression auf. In unstimulierten DLD-1 Zellen kann keine iNOS mRNA nachgewiesen werden, wohingegen IFN γ /IL-1 β /TNF α eine ausgeprägte Expression der iNOS mRNA induziert. Im Gegensatz dazu zeigen *nuclear run-on* Experimente aber eine signifikante Basalaktivität des iNOS-Promotors in unstimulierten DLD-1 Zellen, welche durch IFN γ /IL-1 β /TNF α nur moderat verstärkt werden kann [134, 159, 160]. Diese Beobachtungen stimmen mit der zuvor bereits beschriebenen basalen NF κ B-Aktivität in

diesen Zellen überein. Diese Befunde weisen darauf hin, dass die Regulation der iNOS mRNA-Stabilität eine wichtige Funktion bei der iNOS-Induktion übernimmt. Sequenzanalysen der humanen iNOS mRNA [125] identifizieren sechs AUUU(U)A-Sequenzmotive (**AU-rich elements**; ARE) in der 3'-UTR (**3'-untranslated region**), welche die iNOS mRNA in DLD-1 Zellen destabilisieren [159]. Das ELAV (**embryonic lethal abnormal vision**)-Protein HuR bindet mit hoher Affinität an das distale ARE der iNOS-3'-UTR in DLD-1 Zellen [159]. Die Überexpression von HuR in DLD-1 Zellen resultiert in einer Zunahme der IFN γ /IL-1 β /TNF α -induzierten iNOS-Expression, wohingegen die Hemmung der HuR-Expression die IFN γ /IL-1 β /TNF α -induzierte iNOS-Expression reduziert [159]. Im Gegensatz zu HuR destabilisieren die Proteine der hnRNP D-Familie (**AU binding factor 1**; AUF1) die iNOS mRNA durch ihre Bindung an die ARE der iNOS-3'-UTR in DLD-1 Zellen [161, 162]. Allerdings interagieren HuR und AUF1 mit verschiedenen ARE. Zusätzlich zu HuR und AUF1 sind weitere Proteine an der Regulation der iNOS mRNA-Stabilität beteiligt. Die Überexpression von TTP (**Tristetraprolin**), TIAR (**T cell-restricted intracellular antigen-1-related protein**) und PTB (**polypyrimidine tract-binding protein**) stabilisiert die iNOS mRNA in DLD-1 Zellen und resultiert in einer erhöhten IFN γ /IL-1 β /TNF α -induzierten iNOS-Expression [163-165]. Dagegen signalisiert die Bindung von KSRP (**KH-type splicing regulatory protein**) an das äußerste 3'-lokalisierte ARE die exosomale Degradation der iNOS mRNA in DLD-1 Zellen [166]. Linker et al. zeigen auch, dass KSRP und HuR um die selbe Bindestelle konkurrieren. Die Stimulation mit IFN γ /IL-1 β /TNF α reduziert die Bindung von KSRP, verstärkt aber die Bindung von HuR an das ARE [166]. Ein komplexes Zusammenspiel zwischen KSRP, TTP und HuR ist für die Regulation der iNOS mRNA-Stabilität nach Zytokinstimulation notwendig. So ist beispielsweise gezeigt, dass TTP nicht direkt an das iNOS-3'-UTR bindet, sondern über eine Interaktion mit KSRP dessen destabilisierende Wirkung verhindert [166]. Ein schematischer Überblick zur Regulation der iNOS mRNA-Stabilität in DLD-1 Zellen ist in Abbildung 1.3 nochmals zusammenfassend dargestellt.

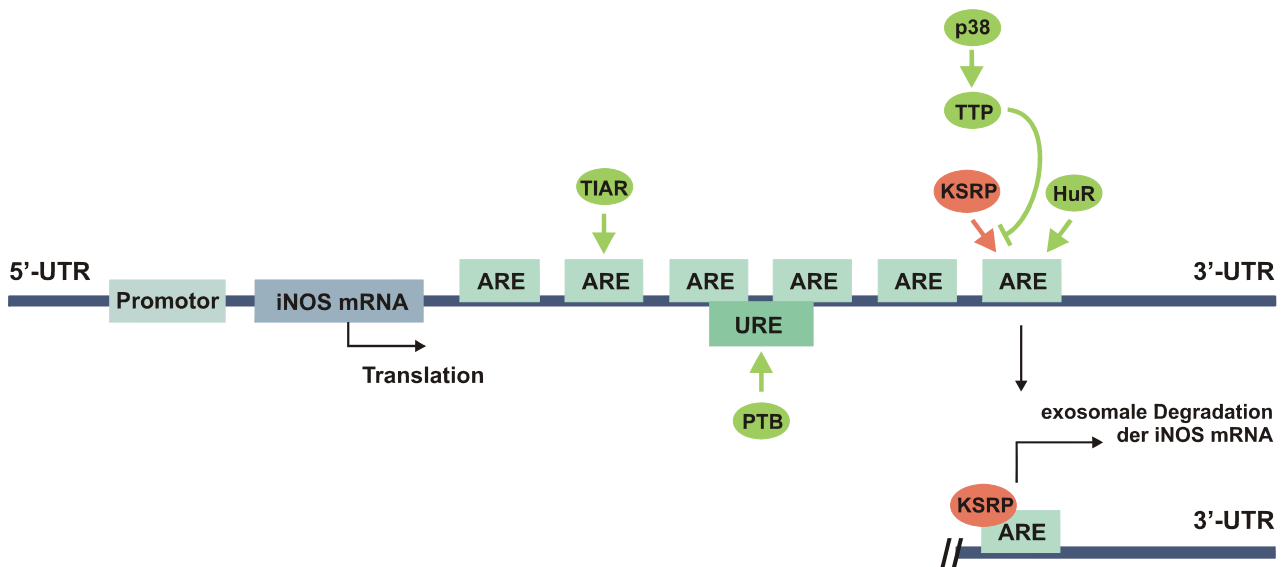


Abbildung 1.3 Die Beeinflussung der iNOS-Stabilität reguliert die iNOS-Translation in DLD-1 Zellen.
(Abbildung erstellt nach [125, 159, 163-166].)

1.5.3 NO fördert die Entwicklung entzündlicher Erkrankungen

Eine gestörte iNOS-Induktion mit folglich extensiver NO-Produktion trägt zu entzündlichen Veränderungen und zur Tumorentstehung bei. Diese hohen NO-Spiegel sind mit hoher Wahrscheinlichkeit an der Pathogenese humaner Erkrankungen wie Asthma, Arthritis, Multipler Sklerose, Kolitis, Psoriasis, neurodegenerativer Erkrankungen, Sepsis und Tumorentwicklung beteiligt [167-169]. Hier zeigt sich die Verknüpfung zwischen Entzündung und Karzinogenese. Tatsächlich gibt es stichhaltige Belege, welche iNOS/NO in Verbindung mit Krebs als potentes Mutagen [170], als Angiogenesefaktor [171], als Verstärker der Protoonkogenexpression [172] und als Inhibitor der Apoptose [173] charakterisieren.

1.5.3.1 NO schädigt zelluläre DNA und Proteine

Die Toxizität von NO wird während einer chronischen Entzündung primär über indirekte Effekte vermittelt. Die Oxidation von NO durch O_2 oder Sauerstoffradikale wie beispielsweise Superoxid (O_2^-) führt zur Bildung reaktiver Stickstoffverbindungen (Peroxynitrit $ONOO^-$; Nitrit NO_2^- ; Nitrat NO_3^- ; Distickstofftrioxid N_2O_3 etc.). Peroxynitrit ist ein potentes

Oxidationsmittel und kann verschiedene zelluläre Zielstrukturen via Nitrierung (Nitrylkation NO_2^+), Nitrosierung/Nitrosylierung (Nitrosylkation NO^+) oder Oxidation schädigen.

Die Nitrosierung von Purinen und Pyrimidinen in der DNA führt zur Transition von GC→AT oder GC→CG. Dies ist beispielsweise eine häufig auftretende Mutation im p53-Gen einiger humaner Tumoren einschließlich Hepatitis B-assoziiertem Leberkarzinom [174] sowie *Helicobacter pylori*-assoziiertem Magenkarzinom [175]. Reaktive Stickstoffverbindungen können zusätzlich DNA-Strangbrüche initiieren [176]. Unter physiologischen Bedingungen würden in diesen Fällen komplexe DNA-Reparaturmechanismen eingreifen. In Situationen mit erhöhter iNOS-Expression und damit verbundener massiver NO-Freisetzung werden allerdings auch Schlüsselenzyme der DNA-Reparatur gehemmt [177]. Somit führen sowohl eine erhöhte p53-Mutationsfrequenz als auch die verminderte Reparatur geschädigter DNA zur Selektion potentiell tumorigener Zellen, die gegen Apoptosesignale resistent sind.

Besonders Tyrosinreste werden durch Peroxynitrit nitriert. Die daraus resultierenden Nitrotyrosin-Verbindungen sind stabile Marker für eine oxidative Proteinschädigung. Diese können sowohl bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen [178, 179] als auch bei verschiedenen Tumoren des Gastrointestinaltraktes [180-182] nachgewiesen werden.

Die Gesamtheit dieser pathophysiologischen Prozesse erlaubt eine Akkumulation von DNA- und Proteinschädigungen sowie eine Dysregulation der Apoptose. Dies fördert die maligne Transformation der Zelle und bildet eine Vorstufe für die Entwicklung invasiver Tumoren.

1.5.3.2 NO fördert die Tumorprogression

Bei vielen malignen Tumoren der Brust [183-185], der Lunge [186], der Prostata [187-189], der Blase [190, 191], des Kolons [180, 181, 192-194] sowie beim Melanom [195] wurde eine gesteigerte iNOS-Expression im Vergleich mit gesundem Kontrollgewebe nachgewiesen. Deshalb sind Untersuchungen zur Funktion von NO im Kontext der Tumorgenese wichtiger Bestandteil aktueller Forschung.

Wenn Tumoren wachsen, benötigen sie eine ausreichende Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen. Mit zunehmender Expansion kann das ursprüngliche Blutgefäßsystem den Tumor nicht mehr genügend mit Sauerstoff beliefern und es entsteht eine lokale Hypoxie. Daher gilt die Neovaskularisierung als Schlüsselfunktion für Tumorwachstum und Metastasierung. Im Kontext mit potentiell angiogenen Eigenschaften der iNOS ist bekannt, dass

NO die Expression des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (*vascular endothelial growth factor*, VEGF) in humanen Karzinomzellen induzieren kann [196, 197]. NO kann auch als intrazellulärer *second messenger* die Expression von IL-8 als indirekten Angiogenesefaktor induzieren [198-201]. Zusätzlich hemmt NO die Expression von Angiostatin und Thrombospondin-1, welche wichtige Inhibitoren der Angiogenese darstellen [202, 203]. Am Beispiel des humanen Kolorektalkarzinoms wurde gezeigt, dass NO die COX-2-Expression induziert und die Interaktion zwischen iNOS und COX-2 resultiert in einer PGE₂-vermittelten Erhöhung der VEGF-Expression [204]. Die erhöhte Produktion von PGE₂ führt zusätzlich zu einer verstärkten Permeabilität des Blutgefäßsystems, was eine Gefäßneubildung fördert [205]. Dies wird durch die Beeinflussung der Synthese und Funktion von Matrixmetalloproteasen durch NO unterstützt [206]. Diese Enzyme sind an der Degradation der vaskulären Basalmembran involviert. Des Weiteren vermittelt NO eine Vasodilation mit der Folge eines im Tumorgewebe verbesserten Blutflusses [207]. Diese Daten legen nahe, dass die Tumor-assoziierte NO-Produktion die Tumorprogression fördert, indem sie den Zellen sowohl einen selektiven Wachstumsvorteil durch die erhöhte p53-Mutationsfrequenz bietet und zugleich die Neovaskularisierung für eine ausreichende Versorgung mit Sauerstoff fördert. Diese Aspekte sind zusätzlich in Abbildung 1.4 zusammenfassend dargestellt.

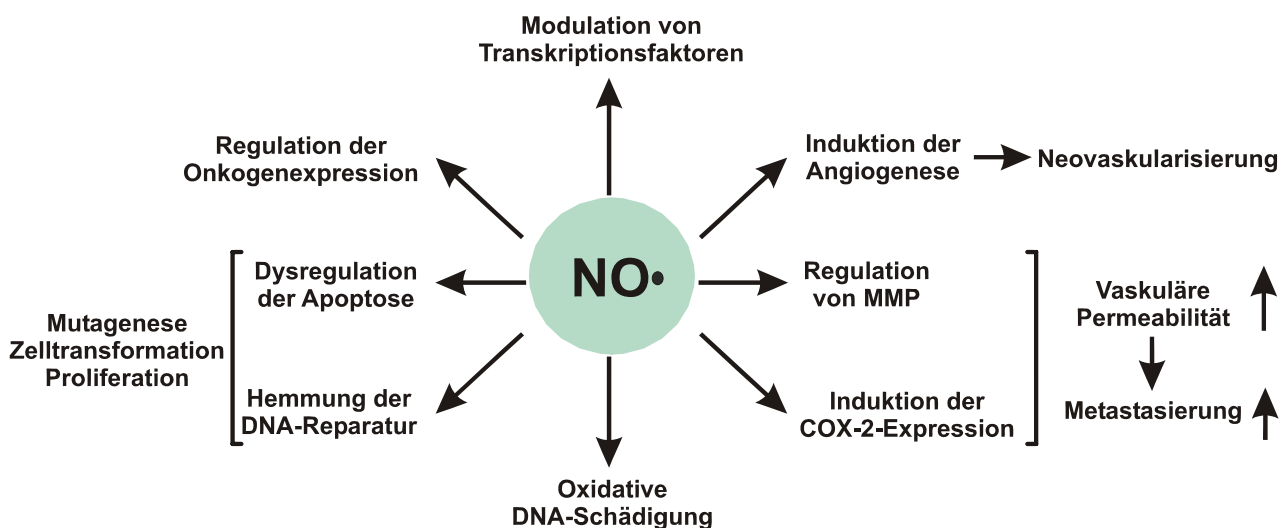


Abbildung 1.4 Die Rolle von iNOS/NO in der Karzinogenese. (Modifiziert nach [169].)

1.6 Sepsis und die Folge einer gestörten Barrierefunktion des Epithels

1.6.1 Immunpathogenese der Sepsis

Die Pathophysiologie der Sepsis ist primär durch das Ausmaß und den Ablauf der Reaktion des Patienten auf die auslösende Infektion und weniger von der Art, Zahl, Pathogenität und Virulenz des Erregers definiert. Eine Sepsis entsteht, wenn eine *per se* sinnvolle Abwehrreaktion des Immunsystems außer Kontrolle gerät. Stattdessen entwickelt sich eine unkontrollierte und generalisierte Immunaktivierung, die autodestruktive Schäden an körpereigenen Geweben und Organen verursacht.

Mechanismen zur Erkennung pathogener Strukturen

Unterschiedliche pathogene Komponenten werden vom angeborenen Immunsystem erkannt und induzieren eine entzündliche Immunantwort. Zu diesen Strukturen, welche allgemein als *pathogen-associated molecular patterns* (PAMP) bezeichnet werden (siehe Kapitel 1.1), zählen beispielsweise das LPS gramnegativer Bakterien, Zellwandbestandteile grampositiver Bakterien (Peptidoglykane, Lipoteichonsäuren) und Pilze, Flagellin sowie bakterielle und virale Nukleinsäuren. Ein wichtiges Merkmal grampositiver Bakterien ist die Produktion potenter Exotoxine. Von großer Bedeutung sind hierbei das *toxic shock syndrome toxin-1* (TSST-1) aus *Staphylococcus aureus* sowie die pyrogenen Exotoxine aus *Streptococcus pyogenes*. Das toxische Schocksyndrom ist eine selten auftretende, akute und schwerwiegende Form des septischen Schocks. Diese Exotoxine können sowohl an MHC-II-Moleküle als auch an einige T-Zellrezeptoren binden und verursachen somit eine massive T-Zellaktivierung mit anschließender Freisetzung proinflammatorischer Zytokine [208]. Aufgrund dieser Eigenschaften werden diese Exotoxine auch als Superantigene bezeichnet.

Bei gramnegativen Bakterien scheint LPS eine dominante Rolle zu spielen. Es bindet im Plasma an das *LPS-bindende Protein* (LBP) und der daraus entstehende Komplex LPS-LBP bindet wiederum an membranständige CD14-Rezeptoren, welche auf der Oberfläche von Monozyten und Makrophagen exprimiert werden [209]. Obwohl CD14 ursprünglich als wichtiger Rezeptor für die LPS-vermittelte Aktivierung von Monozyten identifiziert worden ist, haben nachfolgende Studien gezeigt, dass auch Bestandteile grampositiver Bakterien

(Peptidoglykane) über CD14 eine Aktivierung von Monozyten und Makrophagen induzieren können [210]. Weiterhin ist lösliches CD14 (sCD14) im Plasma nachweisbar, welches CD14-negative Zellen (dendritische Zellen, Fibroblasten, glatte Muskelzellen, Endothelzellen) aktivieren kann. Lösliches CD14 ist auch im Plasma gesunder Donoren nachweisbar, bei Sepsis sind die Plasmaspiegel erhöht [211].

Bis vor wenigen Jahren herrschte Unklarheit darüber, wie der membranständige LPS-LBP-CD14-Komplex zur Zellaktivierung führt, da CD14 keine intrazelluläre Domäne aufweist. Diese Frage wurde mit der Entdeckung der *Toll-like*-Rezeptoren (TLR) geklärt, welche eine intrazelluläre Signaltransduktion vermitteln können [212, 213]. Die TLR-Familie besteht aktuell aus elf TLR, welche ein breites Spektrum an pathogenen Motiven erkennen können [214]. Demnach erkennt TLR2 primär grampositive Zellwandstrukturen und TLR4 dagegen LPS [215]. TLR5 gilt als Flagellinrezeptor [216] und TLR9 bindet unmethylierte CpG-Elemente bakterieller DNA [217], wohingegen TLR3 doppelsträngige virale RNA erkennt [218]. Ein weiteres Molekül, MD-2, ist für die Aktivierung des TLR4 zusätzlich erforderlich [219]. Zusätzlich spielen die kürzlich beschriebenen intrazellulären Proteine NOD1 und NOD2 (*nucleotide-binding oligomerization domain*) eine wichtige Rolle bei der Erkennung von Bestandteilen des Peptidoglykans [220, 221]. Weitere Proteine, welche Peptidoglykane erkennen und zwischen grampositiven und gramnegativen Bakterien differenzieren können, ergänzen die Identifizierung pathogener Strukturen im Wirtsorganismus [222].

Proinflammatorische Signalverstärkung

Die Funktion der initialen angeborenen Immunantwort ist die Koordinierung der Immunabwehr über humorale und zelluläre Komponenten. Mononukleäre Zellen spielen eine zentrale Rolle in der Freisetzung klassischer proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 β , IL-6, IL-18 und TNF α . Zusätzlich werden auch IL-12, IL-15 sowie verschiedene Chemokine sezerniert. Hierbei gelten IL-1 β und TNF α als prototypische inflammatorische Zytokine, welche eine Vielzahl der immunpathologischen Eigenschaften der LPS-induzierten Symptomatik vermitteln [223]. Beide aktivieren nachfolgend eine zweite Welle, wozu die Sekretion weiterer Zytokine, Lipidmediatoren und Sauerstoffradikale zählt. Die verstärkte Expression verschiedener Zelladhäsionsmoleküle unterstützt die Migration inflammatorischer Zellen in das Gewebe. Ein wichtiger Aspekt in der Pathophysiologie der Sepsis ist die Induktion der Koagulation durch proinflammatorische Zytokine wie IL-1 β und IL-6 [224]. Die Folge ist eine verstärkte Produktion sowie ein reduzierter Abbau von Fibrin, da die Ex-

pression natürlicher Antikoagulantien gehemmt wird. Die Fibrinbruchstücke verschließen kleine Blutgefäße und führen so zu einer inadäquaten Gewebepерfusion mit drohendem Organversagen.

Antiinflammatorische Immunsuppression

Zu Beginn ist die Sepsis durch eine Erhöhung entzündlicher Mediatoren definiert. Wenn die Sepsis aber persistiert, vollzieht sich ein Wechsel hin zu einem antiinflammatorischen und immunsuppressiven Status [225, 226]. Bei Patienten im späten Stadium einer Sepsis ist diese manifestierte Immunsuppression durch vier Merkmale charakterisiert:

- Wechsel von einer entzündlichen T_H1 - zu einer antientzündlichen T_H2 -Immunantwort [225, 227]
- fehlende Proliferation und Funktion von T_H1 -Zellen nach Kontakt mit ihrem spezifischen Antigen (Anergie) [228, 229]
- Apoptose-induzierte Depletion von T- und B-Zellen sowie dendritischer Zellen [230-232]
- immunsuppressive Effekte apoptotischer Zellen: Apoptotische Zellen induzieren eine Anergie sowie eine antientzündliche Immunantwort, wohingegen nekrotische Zellen das Immunsystem stimulieren und so die antimikrobielle Abwehr stärken würden [233-235]

In der Literatur wird diese überschießende antientzündliche Gegenregulation als Ursache für die insuffiziente Immunabwehr gegen Infektionen angesehen. Diese Hypothese wird auch durch eine Studie bestätigt, welche zeigt, dass die negativen Folgen einer Sepsis-induzierten Immunsuppression durch die Gabe von $IFN\gamma$ bei Sepsispatienten aufgehoben werden konnten und das Überleben positiv beeinflusst wird [236].

Multiorganversagen als Folge einer persistierenden Sepsis

Die Todesursache einer Sepsis ist das multiple Organversagen. Wenn vier bis fünf Organe versagen, liegt die Mortalität bei weit über 90% [224]. Die Pathogenese der Organdysfunktion und des daraus resultierenden Versagens wird von vielen Faktoren beeinflusst und ist bis heute noch nicht vollständig aufgeklärt. Die Hypoperfusion der Gewebe und die daraus resultierende Hypoxie spielen hier eine wichtige Rolle. Zelluläre Infiltrate schädigen das Gewebe direkt durch die Freisetzung lysosomaler Enzyme und reaktiver Sauerstoffspezies. Proinflammatorische Zytokine induzieren die Aktivierung des iNOS-Signalweges und amplifizieren so die vaskuläre Instabilität. Zusätzlich zeigt die Gruppe um Fink und

Delude in mehreren Arbeiten eindrucksvoll, dass das entzündliche Milieu eines septischen Schocks markante Veränderungen in Struktur und Funktion von *tight junctions* (TJ) im Epithelium hervorruft. Dabei verursachen proinflammatorische Zytokine sowie iNOS und NO eine epitheliale Barrieredysfunktion. Die Folge ist eine Translokation intestinaler Keime, die als wichtiger Amplifikator der Sepsisproblematik einzustufen ist. [237]. Eine weitere Konsequenz der extensiven NO-Produktion ist die verminderte mitochondriale Respiration, welche durch NO gehemmt wird [238].

1.7 Ziele dieser Arbeit

Der Transkriptionsfaktor STAT3 gilt als prominentes Signalmolekül in der Signaltransduktion von IL-22. In der aktuellen Literatur wird STAT3 aufgrund seiner anti-apoptotischen und proliferativen Eigenschaften als Onkogen definiert [239-241]. Sowohl in Patienten mit *Morbus Crohn* [178, 242] als auch im humanen Kolorektalkarzinom [180, 194, 243, 244] ist eine massive Überexpression von STAT3 und iNOS beschrieben. Daher soll im ersten Teil dieser Promotion untersucht werden, ob IL-22 das Potential zur Regulation der iNOS-Expression in epithelialen Kolonkarzinomzellen besitzt und inwiefern STAT3 hier eine Rolle spielt. Da DLD-1 Kolonkarzinomzellen als sehr gut charakterisiertes Zellkulturmodell zur Untersuchung der humanen iNOS gelten, werden für die folgenden Experimente vorwiegend DLD-1 Zellen verwendet.

Der zweite Abschnitt beschäftigt sich mit der Regulation der IL-22-Sekretion im Kontext von Sepsis und systemischer Entzündung. In der Literatur wird IL-22 als potentiell immunregulatorisch eingeschätzt. So stellt sich die Frage, inwiefern IL-22 in einem komplexen und vor allem immunaktivierten klinischen Syndrom der Sepsis vorhanden ist. Es soll die Frage geklärt werden, ob IL-22 in einem Modell der akuten klinischen Sepsis in Ratten oder im Serum von Sepsispatienten nachgewiesen werden kann. Abschließend soll der Einfluss des klassischen antientzündlichen Pharmakons Dexamethason auf die IL-22-Sekretion *in vitro* sowie *in vivo* untersucht werden. Hierzu werden einerseits Untersuchungen in frisch isolierten humanen mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) durchgeführt.

2 Material und Methoden

2.1 Allgemeine Materialien und Geräte

2.1.1 Chemikalien

Soweit nicht anderweitig angegeben, wurden die gängigen Chemikalien bei den Firmen Roth GmbH (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), AppliChem (Darmstadt) bzw. Sigma-Aldrich (Taufkirchen) erworben.

2.1.2 Inhibitoren

Aktinomycin D	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumfluorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumvanadat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Roth GmbH, Karlsruhe
Proteinaseinhibitor-Cocktail (25x)	Roche, Mannheim

2.1.3 Rekombinante Proteine, Pharmaka, Stimuli und Lösemittel

Dexamethason	Calbiochem, Schwalbach
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Flagellin	Alexis Biochemicals, Grünberg
IL-1 β (human)	Invitrogen/Biosource, Karlsruhe
IL-6 (human)	TEBU/Peptrotech, Frankfurt/Main
IL-18 (human)	R&D Systems/MBL, Wiesbaden
IL-22 (human)	TEBU/Peptrotech, Frankfurt/Main
IFN γ (human)	TEBU/Peptrotech, Frankfurt/Main
Lipopolysaccharid (LPS)	Alexis Biochemicals, Grünberg
poly (I-C) (hochrein; Zellkultur)	Amersham Pharmacia, BS

TNF α (human)

Knoll AG, Ludwigshafen

2.1.4 Antikörper

Primärantikörper

	Quelle	Blocken in	Verwendung	
pSTAT3	mk K	5% TM	WB 1:1000 (5% BSA)	New England Biolabs, Frankfurt
STAT3	mk M	5% TM	WB 1:1000 (5% BSA)	New England Biolabs, Frankfurt
pSTAT1	pk K	5% TM	WB 1:1000 (5% BSA)	New England Biolabs, Frankfurt
β Tubulin	mk M	2% BSA	WB 1:1000 (2% BSA)	Santa Cruz Biotechnologies, HD
iNOS	mk M	2% TM	WB 1:500 (2% TM)	BD Biosciences, Heidelberg
IL-18BP α	pk Z	2% TM	WB 1:500 (2% TM)	R&D Systems/MBL, Wiesbaden
p65(NF- κ B)	pk K	-	EMSA 1 μ g	Santa Cruz Biotechnologies, HD
IRF-1	pk K	10% TM	WB 1:200 (10% TM)	Santa Cruz Biotechnologies, HD

(mk monoklonal; pk polyklonal; K Kaninchen; M Maus; Z Ziege; WB Western Blot; TM Trockenmilch)

Sekundärantikörper (Meerrettichperoxidase-konjugiert)

Ziege-anti-Maus IgG	1:10000	Bio-Rad, München
Ziege-anti-Kaninchen IgG	1:10000	Bio-Rad, München
Kaninchen-anti-Ziege IgG	1:10000	Pierce, Rockford, IL, USA

(Die verwendeten Lösungen für die Inkubation des Sekundärantikörpers entsprechen denen der jeweiligen Primärantikörper.)

2.1.5 Kits

Dual-Luciferase Reporter Assay System	Promega, Mannheim
ECL detection system	GE Healthcare, München
Luciferase Assay System	Promega, Mannheim
Qiagen EndoFree Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
IL-22 ELISA (human)	R&D Systems/MBL, Wiesbaden
IP-10/CXCL-10 ELISA (human)	BD Biosciences, Heidelberg
IL-6 ELISA (Ratte)	R&D Systems/MBL, Wiesbaden

IL-18 ELISA (Ratte)	Invitrogen/Biosource, Karlsruhe
IL-22 ELISA (Ratte)	R&D Systems/MBL, Wiesbaden
MIP-2 α ELISA (Ratte)	Invitrogen/Biosource, Karlsruhe
TNF α ELISA (Ratte)	R&D Systems/MBL, Wiesbaden

2.1.6 Puffer

10x PBS	139mM NaCl 2,7mM KCl 8,1mM Na ₂ HPO ₄ 2xH ₂ O 1,5mM KH ₂ PO ₄ pH 7,4
10x TBE	890mM Tris 890mM Borsäure 20mM EDTA

2.1.7 Sonstige Materialien

10cm-Polystyrolplatten	Greiner bio-one, Solingen
6-Loch-Polystyrolplatten	Greiner bio-one, Solingen
24-Loch-Polystyrolplatten	Greiner bio-one, Solingen
Einfrierröhrchen	Greiner bio-one, Solingen
Hyperfilm ECL	GE Healthcare, München
Imager-Screen	BAS-MP 2040S, Fuji, Straubenhardt
Lumi-Film Chemoluminescent Detection Film	Roche, Mannheim
Maxisorp ELISA-Platten	Nunc, Wiesbaden
Nick Columns	Amersham Pharmacia, Braunschweig
Nitrocellulosemembran	Amersham Pharmacia, Braunschweig
Polypropylenröhrchen (runder Boden)	Greiner bio-one, Solingen
Polypropylenröhrchen (konischer Boden)	Greiner bio-one, Solingen
Sterilfilter 0,22 μ m	Millipore, Schwalbach
Whatman 3MM-Papier	Millipore, Schwalbach
Neubauer-Zählkammer	LO Laboroptik, Friedrichsdorf
Zellkulturflaschen (T75cm ²)	Greiner bio-one, Solingen

2.1.8 Geräte

ABI PRISM 310 Genetic Analyser (Sequenzierer)	Applied Biosystems, Darmstadt
ABI PRISM 7500 Fast Real time PCR System	Applied Biosystems, Darmstadt
ABI PRISM 7700 Real time PCR System	Applied Biosystems, Darmstadt
AutoLumat LB953 (Luminometer)	Berthold, Bad Wildbad
Axiovert 25 (Zellkulturmikroskop)	Carl Zeiss AG, Göttingen
Biofuge fresco (Kühlzentrifuge; Rotor 3324)	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
Biofuge pico (Tischzentrifuge; Rotor 3325B)	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
EPS 600 (Energieversorgung)	Amersham Pharmacia, Braunschweig
Geldoc 1000 (Geldokumentation)	Bio-Rad, München
Gel dryer 583 (Geltrockner)	Bio-Rad, München
GNA 100 (Elektrophoresekammer)	Amersham Pharmacia, Braunschweig
Herasafe Sterilbank	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
Hoefer Gel Unit SE400 (Elektrophoresekammer)	Amersham Pharmacia, Braunschweig
Hoefer Mighty Small Dual Gel Caster SE245 (Gießstand)	Amersham Pharmacia, Braunschweig
Hoefer Mighty Small SE250/SE260 (Elektrophoresekammer)	Amersham Pharmacia, Braunschweig
Hoefer SemiPhor TE77 (Blotapparatur)	Amersham Pharmacia, Braunschweig
Hyperprocessor ECL (Filmprozessor)	Amersham Pharmacia, Braunschweig
Inkubator Heraeus BBD 6220	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
Kulturschüttler	Unitron Infors AG, Bottmingen, Schweiz
Megafuge 1.0 (Zellkulturzentrifuge; Rotor 757507F)	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
Microplate Reader Sunrise	Tecan Trading AG, Männedorf, Schweiz
Multifuge 3 L-R (Rotor 75006441)	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
NanoDrop-Spektrophotometer	Peqlab Biotechnologie, Erlangen
Phosphoimager BAS 1500	Raytest, Straubenhardt
Power Pac 3000 (Energieversorgung)	Bio-Rad, München
T3000 Thermocycler	Biometra, Göttingen
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
TRI-CARB 2100 TR β -counter	Canberra-Packard, Dreieich
Ultra Turrax	IKA, Staufen
Wide Mini Sub Cell GT (Elektrophoresekammer)	Bio-Rad, München

2.1.9 Statistik

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mittels GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software, Inc.; La Jolla, CA, USA). Der jeweils verwendete Test ist in der entsprechenden Abbildungslegende angegeben.

2.2 Bakterienkultur

2.2.1 Herstellung chemisch-kompetenter Bakterien

Ampicillin	AppliChem, Darmstadt
<i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>) DH5α	Invitrogen, Karlsruhe
<i>lysogeny broth</i> (LB)-Medium	1% Trypton (w/v) 0,5% Hefeextrakt (w/v) 1% NaCl (w/v) Ampicillin (100µg/ml)

Zur Herstellung chemisch-kompetenter Zellen wurden 50ml LB-Medium mit 50µl einer Übernachtskultur angeimpft und ca. 4h bei 37°C inkubiert, bis die Kultur eine optische Dichte (OD) von 0,3 - 0,4 erreicht hatte. Die Kultur wurde 15min auf Eis inkubiert und anschließend für 10min bei 4°C und 4.000rpm zentrifugiert (Multifuge 3 L-R). Die Resuspension des Pellets erfolgte mit 20ml einer eiskalten 100mM CaCl₂-Lösung. Nach einer Inkubation von 5min auf Eis wurde die Kultur bei 4°C und 4.000rpm für 10min erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 4ml einer eiskalten 100mM CaCl₂-Lösung resuspendiert und nach 20min auf Eis mit 1ml Glycerol versetzt. Die Bakteriensuspension wurde à 200µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.2.2 Retransformation chemisch-kompetenter Bakterien

Je Transformationsansatz wurden 100µl einer kompetenten Bakteriensuspension auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe von 1-10ng Plasmid-DNA erfolgte eine Inkubation für 20min auf

Eis, ein Hitzeschock für 90s bei 42°C und eine erneute Inkubation von 10min auf Eis. Danach wurden 900µl LB-Medium hinzugefügt und der Ansatz für eine Stunde bei 37°C schüttelnd inkubiert. Entsprechend des Selektionsmarkers des Plasmids wurden die transformierten Bakterien direkt in 100ml LB-Medium mit Ampicillin über Nacht bei 37°C und 140rpm im Schüttelinkubator kultiviert.

2.2.3 Präparative Plasmidisolierung

Durch eine Maxipräparation kann Plasmid-DNA in einem größeren Maßstab isoliert werden. Da die isolierten Plasmide für Zellkulturarbeiten mit Endotoxin-sensitiven eukaryotischen Zellen genutzt werden sollten, wurde das EndoFree-System von Qiagen verwendet. Für die Isolierung wurden 100ml LB-Medium (+Ampicillin) mit 100-150µl einer Transformationsreaktion angeimpft und über Nacht bei 37°C und 140rpm im Schüttelinkubator kultiviert. Am darauffolgenden Tag wurde die Bakteriensuspension sedimentiert und nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

2.3 Zellkultur

2.3.1 Zellkulturmedien und Zusätze

DMEM + GlutaMax	Dulbecco's modified Eagl's medium (pH 7,0) 4,5g/l D-Glucose; 29,23g/l L-Glutamin; 3,7g/l NaHCO ₃
Vollmedium (DLD-1; Caco-2)	DMEM + GlutaMax, 10% FKS (hitzeinaktiviert), 100U/ml Penicillin, 100µg/ml Streptomycin (sterilfiltriert)
RPMI 1640 + GlutaMax	Roswell Park Memorial Institute Medium (pH 7,0) 2g/l D-Glucose; 0,45g/l L-Glutamin; 2g/l NaHCO ₃
Vollmedium (PBMC)	RPMI 1640 + GlutaMax, 1% humanes Serum (hitzeinaktiviert), 10mM HEPES, 100U/ml Penicillin, 100µg/ml Streptomycin (sterilfiltriert)

Fötales Kälberserum (FKS)	Biochrom, Berlin
G418 (Genitacin)	Invitrogen/Gibco, Karlsruhe
Humanes Serum (HS)	Invitrogen, Karlsruhe

Alle verwendeten Medien und Zusätze wurden von den Firmen Invitrogen/Gibco (Karlsruhe) und Biochrom (Berlin) bezogen.

2.3.2 Zelllinien

DLD-1	humane epitheliale Kolonkarzinomzellen (Centre for Applied Microbiology and Research, Salisbury, UK)
DLD-1/pXP ₂ -16kb	humane epitheliale Kolonkarzinomzellen (DLD-1 Zellen mit stabiler Überexpression der <i>Photinus pyralis</i> (Firefly)-Luciferase unter der Kontrolle eines 16kb-iNOS-Promotorkonstrukts) (Prof. Dr. Hartmut Kleinert, Johannes-Gutenberg-Universität Mainz)
Caco-2	humane epitheliale Kolonkarzinomzellen (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig)

2.3.3 Kultivierung der Zelllinien

Humane DLD-1 und Caco-2 Kolonkarzinomzellen wurden in Vollmedium bei 37°C unter Begasung mit 5% CO₂ in einem Brutschrank mit wassergesättigter Atmosphäre kultiviert. Konfluent gewachsene DLD-1 Zellen wurden zum Passagieren einmal mit PBS gewaschen und durch Inkubation mit 0,05% Trypsin/EDTA (Invitrogen/Gibco, Karlsruhe) bei 37°C vom Boden einer T75cm²-Flasche gelöst. Dieser Vorgang wurde durch Zugabe von Vollmedium gestoppt. Die Zellen wurden nun nach Bedarf ausgelegt. Wenn eine definierte Zelldichte benötigt wurde, wurde diese mittels einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. DLD-1/pXP₂-16kb wurden in Vollmedium unter Zusatz von 0,5mg/ml G418 (Invitrogen/Gibco, Karlsruhe) kultiviert. Unter Versuchsbedingungen wurde auf G418 verzichtet.

Alle Versuche mit Caco-2 Zellen wurden zum Zeitpunkt der Postkonfluenz durchgeführt. Es wurde beschrieben, dass die Zellen in diesem Stadium ihre Sensibilität für IFN γ ausbilden [245]. Für diesen Zweck wurden nahezu konfluente Caco-2 Zellen für weitere 14 Tage in 6-Loch-Platten kultiviert, bevor die Versuche durchgeführt wurden.

2.3.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Die Zellen wurden nach dem Waschen mit PBS und einer Inkubation mit Trypsin/EDTA in Vollmedium aufgenommen und für 5min bei 800rpm (Heraeus Megafuge 1.0) sedimentiert. Anschließend wurde das Pellet in 1ml Einfriermedium (90% FKS; 10% DMSO) aufgenommen, in Einfrierröhrchen überführt und bei -80°C in einem Styroporbehältnis langsam eingefroren. Anschließend wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff gelagert.

Das Auftauen von Zellen erfolgte bei 37°C mit anschließender Aufnahme in Vollmedium und Überführung in eine Zellkulturflasche.

2.3.5 Transiente Transfektion von Zellen

2.3.5.1 Transfektion von Zellen mit siRNA

Silencer Negative Control siRNA (#4611)	Ambion/Applied Biosystems, Cambridgeshire, UK
STAT3-siRNA (#51320)	Ambion/Applied Biosystems, Cambridgeshire, UK
Oligofectamine	Invitrogen, Karlsruhe

Zur transienten Transfektion von DLD-1 Zellen wurde eine spezifische siRNA gegen STAT3 verwendet. Als Kontrolle diente eine siRNA, die keine Sequenzhomologie mit dem humanen Genom aufweist. Für die Transfektion wurden zunächst 2×10^5 Zellen in 6-Loch-Polystyrolplatten in Vollmedium ausgelegt. Nach 24h wurden die Zellen dann mit 50nM der jeweiligen siRNA unter Verwendung von Oligofectamine nach Angaben des Herstellers transfiziert. Als weitere Kontrolle wurden Zellen ohne siRNA (Kontroll-siRNA oder STAT3-

siRNA) mitgeführt, die einzig mit Oligofectamine behandelt wurden (*mock*-Transfektion). 72h nach Transfektion wurden die Zellen gewaschen und wie angegeben stimuliert.

2.3.5.2 Transfektion von Zellen mit Plasmiden

pGAS-Luc (#219093) (PathDetect® <i>in vivo</i> signal transduction pathway <i>cis</i> -reporting system)	Stratagene, Heidelberg
pCIS-CK (#219090) (PathDetect® <i>in vivo</i> signal transduction pathway <i>cis</i> -reporting system)	Stratagene, Heidelberg
pRL-TK	Promega, Mannheim
Lipofectamine	Invitrogen, Karlsruhe
Lipofectamine Plus	Invitrogen, Karlsruhe

Für die transiente Transfektion von DLD-1 Zellen mit 0,1-1µg Plasmid-DNA wurde Lipofectamine in Kombination mit Lipofectamine Plus verwendet. Pro Transfektionsansatz wurden $3,5 \times 10^5$ Zellen in 2ml Vollmedium in 6-Loch-Polystyrolplatten ausgelegt und den Angaben des Herstellers entsprechend behandelt. 24 Stunden später wurden die Zellen mit PBS gewaschen und konnten wie angegeben stimuliert werden.

2.3.6 Isolierung humaner PBMC

Histopaque 1077	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
-----------------	----------------------------

Für die Isolierung peripherer mononukleärer Zellen des Blutes (PBMC) wurde von gesunden Donoren, die im Zeitraum von zwei Wochen vor Blutentnahme keinerlei Medikamente zu sich genommen haben, 45 - 50ml venöses Blut entnommen. Das Studienprotokoll wurde zuvor von der Ethikkommission des Klinikums der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main genehmigt. Die Isolierung erfolgte mittels Histopaque 1077 nach Angaben des Herstellers. Das entnommene Blut wurde mit PBS verdünnt (3VT Blut + 5VT PBS) und das Histopaque dann durch langsames Zugeben des verdünnten Blutes überschichtet (8VT verdünntes Blut zu 3VT Histopaque). Es erfolgte eine Dichtezentrifugation bei 1400rpm und ausgeschalteter Bremse (Heraeus Megafuge 1.0) für 30min, wodurch eine Phasentrennung des Blutgemisches erreicht wurde.

Die PBMC wurden mit einer Pipette abgenommen, auf 50ml mit PBS aufgefüllt und bei 1100rpm für 15min zentrifugiert. Es folgte ein zweimaliges Waschen mit je 20ml PBS (1100rpm für 10min). Anschließend wurden die Zellen in 30ml PBS aufgenommen und die Zellzahl bestimmt. Danach wurden die Zellen zu 3×10^6 Zellen/ml in Vollmedium (PBMC) aufgenommen und je 1ml auf Polypropylenröhrchen (runder Boden) verteilt, die nachfolgend nur lose verschlossen wurden. Die Zellen konnten nun gemäß Protokoll stimuliert und im Brutschrank bei 37°C unter Begasung mit 5% CO₂ in einer wassergesättigten Atmosphäre für den gewünschten Zeitraum kultiviert werden.

2.4 Molekularbiologische Techniken

2.4.1 Isolierung von RNA aus eukaryotischen Zellen

Chloroform	AppliChem, Darmstadt
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tri Reagent	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Generell ist zu beachten, dass alle hierfür verwendeten Lösungen mit DEPC-behandeltem Wasser angesetzt werden, um die Gefahr einer Kontamination mit RNasen zu minimieren. Hierzu gibt man 1/1000 Volumen DEPC zu, lässt das Wasser über Nacht bei RT unter dem Abzug rühren und autoklaviert anschließend die Lösung. Das DEPC zerfällt dabei in CO₂ und Ethanol.

Die RNA-Isolation wurde nach Angaben des Herstellers mit Tri Reagent durchgeführt. Die Zellen wurden dazu direkt in der Polystyrolplatte bzw. nach Überführung in ein Falcon-Röhrchen (PBMC) mit einem adäquaten Volumen (1ml/10cm-Schale; 500µl/6-Loch-Platte; 500µl/Falcon) an Tri Reagent lysiert und resuspendiert. Nach Überführung in ein 1,5ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß folgte die Zugabe von 200µl Chloroform à 1ml Tri Reagent bzw. 100µl Chloroform à 500µl Tri Reagent, 15s Schütteln und eine Inkubation von 2-3min bei RT. Anschließend wurden die Proben für 15min bei 4°C und 13.000rpm (Biofuge fresco) zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde nun in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Dabei sollte das Verschleppen von Protein bzw. genomischer DNA aus der Interphase vermieden werden. Nach Zugabe von 0,7 Volumenteilen Isopropanol und erneutem Schütteln wurde die RNA für 10min bis 2h auf Eis präzipitiert. Es

folgte eine weitere Zentrifugation für 15min bei 4°C und 13.000rpm. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 800µl 70% Ethanol gewaschen. Nach Zentrifugation für 20min bei 4°C und 13.000rpm wurde das Pellet bei RT getrocknet und in einem entsprechenden Volumen (15 - 300µl) Wasser aufgenommen. Um die RNA vollständig zu lösen, wurde die Suspension für 5min bei 56°C erwärmt. Anschließend folgte die Bestimmung der RNA-Konzentration (siehe Kapitel 2.4.3). Bis zur weiteren Verwendung wurde die RNA bei -80°C eingefroren.

2.4.2 Isolierung von RNA aus tierischen Organen

Die Milz der Ratten (siehe Kapitel 2.6) wurde in Polypropylenröhrchen (runder Boden) überführt und in 3ml Tri Reagent mit einem Ultra Turrax homogenisiert. Die weitere RNA-Isolierung erfolgte unter Verwendung von 600µl Chloroform und 0,7 Volumenteilen Isopropanol (bezogen auf das Volumen der abgenommenen oberen wässrigen Phase nach der Zentrifugation). Alle Zentrifugationsschritte wurden bei 4300rpm in der Multifuge 3 L-R (Rotor 75006441) durchgeführt. Der weitere Ablauf ist identisch mit dem in Kapitel 2.4.1 beschriebenen Protokoll.

2.4.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von DNA/RNA-Lösungen erfolgte photometrisch mit Hilfe des NanoDrop-Spektrophotometers (Peqlab Biotechnologie) durch die Bestimmung der Absorption der DNA/RNA-Lösung bei 260nm und bei 280nm. Ein OD₂₆₀ von 1 entspricht dabei einer Konzentration von 50ng/µl doppelsträngiger DNA oder 40ng/µl einzelsträngiger DNA und RNA. Das Verhältnis von OD₂₆₀ zu OD₂₈₀ gibt die Reinheit der DNA/RNA-Probe an. Nahezu proteinfreie Lösungen besitzen einen Wert zwischen 1,8 und 2,0.

2.4.4 RNase-Verdau-Schutzanalyse (RNase Protection Assay; RPA)

$[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-UTP}$ [800Ci/mmol]	GE Healthcare, München
Rotiphorese Gel 40 (Acrylamid/Bisacrylamid 29:1)	Roth GmbH, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Bromphenolblau	AppliChem, Darmstadt
Chloroform	AppliChem, Darmstadt
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
8-Hydroxychinolin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Phenol	AppliChem, Darmstadt
Piperidin-1,4-bis-(2-ethansulfonsäure) (PIPES)	Merck, Darmstadt
Proteinase K [10µg/µl]	Roche, Mannheim
RNase A [10µg/µl]	Roche, Mannheim
RNase T ₁ [100U/µl]	Roche, Mannheim
RNase-Inhibitor [40U/µl]	Promega, Mannheim
T7 RNA-Polymerase [20U/µl]	Roche, Mannheim
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Roth GmbH, Karlsruhe
tRNA (RNase frei) [10µg/µl]	Roche, Mannheim
basisches Phenol	22,5ml Phenol + 8-Hydroxychinolin 22,5ml Chloroform 5,0ml 1M Tris/HCl pH 9,5
25x TBE	2,225M Tris 2,225M Borsäure 50mM EDTA
FLB 80-Puffer	80% deionisiertes Formamid (v/v) 1mM EDTA pH 8,0 0,01% TBE (v/v) 0,05% Bromphenolblau (w/v) 0,05% Xylencyanol (w/v)
FAB-Puffer	80% deionisiertes Formamid (v/v) 1mM EDTA pH 8,0 0,4M NaCl 40mM PIPES pH 6,4

RNase-Puffer

5mM EDTA pH 8,0
0,3M Natriumazetat pH 7,0
10mM Tris/HCl pH 7,5
36µg/ml RNase A
721,5U/µl RNase T1

Generell ist zu beachten, dass alle hierfür verwendeten Lösungen mit DEPC-behandeltem Wasser angesetzt werden. (siehe Kapitel 2.4.1).

Mit dieser Methode kann die Menge einer bestimmten mRNA in einer Gesamt-RNA nachgewiesen und quantifiziert werden. Dabei wird die RNA mit einer radioaktiv markierten RNA-Sonde hybridisiert und anschließend sämtliche nicht hybridisierte RNA durch einen Verdau mit einzelstrangspezifischen RNasen abgebaut. Unter den gewählten Bedingungen führt jeder *missmatch* zum Abbau des Hybrids durch die RNasen. Nach abschließender Denaturierung der Hybride bei 95°C werden die Fragmente elektrophoretisch in einem Harnstoff/Acrylamid-Gel aufgetrennt. Nachfolgend wird die Menge an verbleibender Sonde bestimmt, die sich proportional zur ursprünglich vorhandenen mRNA-Menge verhält. In der vorliegenden Arbeit wurde der RPA zur Analyse der iNOS mRNA-Expression in DLD-1 Zellen verwendet. Als interner Standard wurde in jedem Analyseansatz zusätzlich zur iNOS die mRNA-Expression des Haushaltsgens **Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)** bestimmt.

***in vitro*-Transkription**

Für die Markierung der linearisierten RNA-Sonde (Linearisierung durch Inkubation bei 65°C für 5min) wurde eine *in vitro*-Transkription mit folgendem Ansatz durchgeführt:

1µg RNA-Sonde (siehe Anhang)
1,1µl DEPC-H₂O
1µl 10x Nukleotid-Mix (5mM ATP, GTP, CTP)
2µl 5 x Transkriptionspuffer
0,4µl RNase-Inhibitor (40U/µl)
1µl T7 RNA-Polymerase [20U/µl]
3,5µl [α^{32} P]-UTP (800Ci/mmol)

Der Transkriptionsansatz wurde für 1h bei 37°C inkubiert. Abgestoppt wurde die Reaktion mit 90µl DEPC-H₂O und 100µl basischem Phenol. Nach gutem Mischen und Zentrifu-

gation (Biofuge fresco; 5min, 13.000rpm, 4°C) wurde die wässrige obere Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die radioaktiv markierte RNA-Sonde wurde durch Zugabe von 350µl Ethanol, 40µl Ammoniumazetat (7,5M) und 20µg tRNA präzipitiert. Nach Zentrifugation (15min, 13.000rpm, 4°C) wurde das Pellet in 20µl FLB 80-Puffer aufgenommen und über ein Harnstoff/Acrylamid-Gel (5% Acrylamid/Bisacrylamid 29:1, 8M Harnstoff, 1x TBE) bei 300V mit 1x TBE als Laufpuffer aufgetrennt.

Die radioaktiv markierte RNA-Sonde wurde durch Autoradiographie lokalisiert, mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten und mit Elutionspuffer (0,1x TBE, 0,2% SDS) eluiert. Die Bestimmung der Aktivität der RNA-Sonde erfolgte mit einem TRI-CARB 2100 TR β-Counters (Canberra-Packard).

Hybridisierung

Zu 20µg mRNA wurden 50.000 - 100.000cpm der markierten RNA-Sonden (GAPDH und iNOS) gegeben. Das Gemisch wurde mit 200µl Ethanol/3M Natriumazetat pH 5,2 (25:1) bei -20°C präzipitiert und anschließend zentrifugiert (15min, 13.000rpm, 4°C). Das Präzipitat wurde in 30µl FAB-Puffer sorgfältig resuspendiert und dann für 15min auf 85°C erhitzt. Die anschließende Hybridisierung der radioaktiven RNA-Sonde mit der RNA erfolgte bei 42°C über Nacht.

Enzymatischer Verdau und analytische Gelelektrophorese

Nach erfolgter Hybridisierung wurde die noch vorhandene einzelsträngige RNA durch Zugabe von 300µl RNase-Puffer und anschließender Inkubation bei 30°C für 1h verdaut. Zur Inaktivierung der RNasen wurden 6,5µl 10% SDS und 4,4µl Proteinase K (10µg/µl) zugesetzt und 15min bei 42°C inkubiert. Es folgte eine RNA-Extraktion mit basischem Phenol (Zentrifugation: 13.000rpm; 5min; 4°C). Die wässrige obere Phase wurde mit 880µl Ethanol und 20µg tRNA versetzt und bei -20°C präzipitiert. Nach Zentrifugation (15min, 13.000rpm, 4°C) wurde das Pellet in 25µl FLB 80-Puffer aufgenommen und resuspendiert. Nach 5-minütiger Inkubation bei 95°C wurden die Proben auf ein Harnstoff/Acrylamid-Gel (5% Acrylamid/Bisacrylamid 29:1, 8M Harnstoff, 1x TBE) geladen und bei 300V mit 1x TBE als Laufpuffer elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wurde getrocknet und nach Exposition auf einen Imager-Screen (BAS-MP 2040S, Fuji, Straubenhardt) erfolgte die Auswertung durch Nutzung des Phosphorimager BAS-1500 (Fuji, Straubenhardt) mit dazugehöriger Software.

2.4.5 Reverse Transkription (RT)

10x PCR-Puffer II	Applied Biosystems, Darmstadt
MgCl ₂ [25 mM]	Applied Biosystems, Darmstadt
Moloney Virus Reverse Transkriptase [50U/μl]	Applied Biosystems, Darmstadt
Nukleotidtriphosphate (dATP/dCTP/dGTP/dTTP) [je 2,5mM]	Roche, Mannheim
Random Hexamer Primer [50 μM]	Applied Biosystems, Darmstadt
RNase-Inhibitor (RT-PCR) [20U/μl]	Applied Biosystems, Darmstadt

Isolierte RNA kann mit Hilfe einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase (Reverse Transkriptase) in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Die cDNA wird anschließend als Ausgangsmaterial für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) verwendet (siehe Kapitel 2.4.6), um einzelne Transkripte in den Zellen nachzuweisen.

Für die Synthese wurden zufällig generierte hexamere Primer verwendet, um möglichst alle RNA-Moleküle in cDNA übersetzen zu können. Pro Reaktion wurde folgender Gesamtansatz von 20μl zusammengegeben und nebenstehendes Programm durchgeführt:

1μg Gesamt-RNA	Programm:
4μl MgCl ₂ [25mM]	30min 42°C
2μl 10x PCR-Puffer II	5min 99°C
4μl dNTP-Mix [je 2,5mM]	(anschließende Lagerung bei 4°C)
1μl RNase Inhibitor [20U/μl]	
1μl Random Hexamer Primer [50μM]	
1μl Reverse Transkriptase [50U/μl]	
x μl DEPC-H ₂ O (ad 20μl)	

2.4.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

5x GoTaq PCR-Puffer	Promega, Mannheim
GoTaq DNA-Polymerase (5U/μl)	Promega, Mannheim
Nukleotidtriphosphate (dATP/dCTP/dGTP/dTTP) [je 2,5mM]	Roche, Mannheim

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine Methode zur Amplifikation spezifischer Nukleotidsequenzen und dient dem Nachweis einzelner Transkripte des Genoms. Eine PCR-Reaktion besteht aus der zyklischen Wiederholung von Denaturierung der cDNA-

Matrize, Anlagerung kurzer spezifischer Nukleotidsequenzen (Primer) und Verlängerung des spezifischen Nukleotidbereichs (Elongation). Um eine Kontamination mit amplifizierten genomischen cDNA-Sequenzen zu vermeiden, wurden Amplikons gewählt, welche Exon/Intron-Grenzen überqueren. Für eine PCR-Reaktion wurde folgender 50µl-Gesamtansatz auf Eis zusammengegeben:

2µl cDNA
4µl dNTP-Mix [je 2,5mM]
10µl 5x GoTaq PCR-Puffer
0,2µl GoTaq-Polymerase [5U/µl]
2,5µl je Primer [je 5µM] (siehe Anhang)
28,8µl H₂O bidest

Das Programm der anschließenden Amplifikation variierte je nach Amplikon in Zyklenzahl und Temperatur für die sequenzspezifische Primeranlagerung. Für einen semiquantitativen Vergleich von amplifizierten PCR-Produkten wurde die Zyklenzahl so gewählt, dass sie sich im linearen Bereich der Amplifikation befindet. Eine Analyse von 10µl des PCR-Ansatzes erfolgte mittels Gelelektrophorese (siehe Kapitel 2.4.7.2)

Denaturierung der cDNA	10min	94°C
Denaturierung	30s	94°C
Primeranlagerung	30s / 1min	primerabhängig (siehe Anhang)
Elongation	1min	72°C
Endelongation	7min	72°C

Zur Bestätigung der Identität des Amplikons wurde dieses anschließend sequenziert (ABI PRISM 310 Genetic Analyser, Applied Biosystems) (siehe Kapitel 2.4.9).

2.4.6.1 Quantitative und semiquantitative *real time* – PCR

Platinum Quantitative PCR SuperMix (2x) (Premix Non-Fast)	Invitrogen, Karlsruhe
Rox Reference Dye	Invitrogen, Karlsruhe
TaqMan Fast Universal PCR Master Mix (2x) (Premix Fast)	Applied Biosystems, Darmstadt

Mit Hilfe der *real time*-PCR lässt sich eine PCR-Reaktion in Echtzeit analysieren. In dieser Arbeit wurde zunächst die humane IL-18BPα/GAPDH mRNA-Expression mittels quantitativer *real time*-PCR analysiert. Zusätzlich wurde die semiquantitative *real time*-PCR zur Bestimmung der humanen IL-22/GAPDH mRNA-Expression sowie der Charakterisierung der IL-17, IL-22 sowie GAPDH mRNA im Rattengewebe genutzt. Die hierfür verwendeten genspezifischen Nukleotidsonden (siehe Anhang) sind am 5'-Ende mit einem Reporterfluoreszenz-Farbstoff (VIC für GAPDH; FAM für IL-17, IL-18BPα und IL-22 (Mensch und Ratte)) markiert. Die Fluoreszenz ist bei diesen Sonden zunächst unterdrückt, da sich am 3'-Ende der Sonde ein Fluoreszenz-„Löcher“ (Quencher) befindet (TAMRA). Die Sonde bindet während der PCR-Reaktion an die spezifische Matrize. Wird nun die Matrize amplifiziert, kommt es durch die Exonuklease-Aktivität der *Taq*-Polymerase zum Abbau der Sonde. Dadurch entfernen sich Reporterfluoreszenzfarbstoff und Quencher voneinander, wodurch die Fluoreszenz der Probe proportional zur Entstehung des PCR-Produktes ansteigt. Die Quantifizierung der PCR-Reaktion erfolgte durch Messung der Reporterfluoreszenz während der PCR-Zyklen mit Hilfe des ABI PRISM 7500/7700.

Quantitative *real time*-PCR

Die für den Nachweis der IL-18BPα mRNA-Expression genutzten Primer sowie die Sonde wurden unter Verwendung von *Primer Express* (Applied Biosystems) anhand der publizierten Sequenz (XM_035063.1) generiert (siehe Anhang). Um eine Kontamination mit amplifizierten genomischen cDNA-Sequenzen zu vermeiden, wurde ein Amplikon gewählt, welches Exon/Intron-Grenzen überquert. Die Spezifität der gewählten Primer wurde mittels klassischer PCR überprüft und das Amplikon durch Sequenzierung bestätigt. Für die GAPDH mRNA-Expression wurden bereits fertige Reagentien (PDAR-Mix; ***pre-developed assay reagents***, Applied Biosystems) verwendet. Für die Reaktion wurde folgender 25µl-Ansatz zusammengegeben und anschließend nebenstehendes PCR-Programm durchgeführt:

Ansatz:	1µl	cDNA (RT-Produkt siehe 2.4.5)	Programm:	2min	50°C
	1,25µl	PDAR-Mix (GAPDH)		2min	95°C
	12,5µl	Premix Non-Fast		40 Zyklen:	
	0,5µl	ROX		15s	95°C
	9,75µl	H ₂ O bidest		1min	60°C

alternativ zum PDAR-Mix (bei selbstgenerierten Primern und Sonde für IL-18BPα):

Primer	je 0,5µl (Endkonzentration: 200nM)
Sonde	0,5µl (Endkonzentration: 250nM)
H ₂ O bidest	9,5µl

Die Auswertung und Quantifizierung der mRNA-Expression erfolgte mittels ABI PRISM 7700 System SDS-Software. Die Expression der mRNA wurde durch die Verwendung von klonierten cDNA-Standards für IL-18BPα und GAPDH quantifiziert. Alle Ergebnisse der IL-18BPα-Expression wurden zu den Werten der GAPDH mRNA ins Verhältnis gesetzt. Bei dieser absoluten Quantifizierung wurde das Vorhandensein eines Transkripts in verschiedenen Ansätzen auf die gleichzeitige Amplifikation einer internen Kontrolle (GAPDH) normalisiert. Dazu wurde anhand der mittleren Zyklenzahlen (CT-Wert; *threshold cycles*) des Referenzgen (GAPDH) und des zu untersuchenden Gens (IL-18BPα) mittels der mitgeführten cDNA-Standards eine absolute Kopienzahl berechnet. Die absoluten Kopienzahlen des zu untersuchenden Gens wurden mit den absoluten Kopienzahlen der GAPDH verrechnet. Zur Berechnung der x-fachen Induktion wurden diese normalisierten Werte nun abhängig von den Versuchsbedingungen vergleichend ins Verhältnis gesetzt. In diesem Fall wurden stimulierte Versuchsansätze mit einer unstimulierten Referenzbedingung verglichen. Mathematisch erfolgte dies ebenfalls über eine Differenzbildung aus den normalisierten Werten der zu vergleichenden Ansätze.

Semiquantitative *real time*-PCR

Für den Nachweis der humanen IL-22 / GAPDH mRNA-Expression wurden bereits fertige Reagentien sowohl für IL-22 als auch für GAPDH (PDAR-Mix, Applied Biosystems) verwendet. Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes sowie das Programm entsprachen dabei denen der quantitativen *real time*-PCR. Die Auswertung und Quantifizierung der mRNA-Expression erfolgte mittels ABI PRISM 7500 System SDS-Software, wobei in diesem Set an Experimenten keine klonierten cDNA-Standards verwendet wurden (semiquantitativ). Für die Berechnung der x-fachen Induktion wurde die $2^{\Delta\Delta CT}$ -Methode verwendet [246, 247]. Bei dieser relativen Quantifizierung wurde das Vorhandensein eines Trans-

kripts in verschiedenen Ansätzen auf die gleichzeitige Amplifikation einer internen Kontrolle (GAPDH) normalisiert. Dazu wurde die Differenz aus den mittleren Zyklenzahlen (CT-Werte) des Referenzgens (RG: GAPDH) und des zu untersuchenden Gens (GOI; *gene of interest*: IL-22) ermittelt (ΔCT). Diese normalisierten CT-Werte wurden nun abhängig von den Versuchsbedingungen vergleichend ins Verhältnis gesetzt. In diesem Fall wurden stimulierte Versuchsansätze (Probe) mit einer unstimulierten Referenzbedingung verglichen. Mathematisch erfolgte dies ebenfalls über eine Differenzbildung aus den ΔCT -Werten der zu vergleichenden Ansätze ($\Delta\Delta CT$). Da es für jeden CT-Wert zu einer Verdopplung des Amplikons während der *real time*-PCR kommt, kann eine x-fache Induktion der Probe zur Referenzbedingung aus dem $\Delta\Delta CT$ -Verhältnis wie folgt bestimmt werden:

$$x - \text{fache Induktion} = 2^{\Delta\Delta CT}$$

mit $\Delta\Delta CT = \Delta CT(\text{Probe}) - \Delta CT(\text{Referenzbedingung})$
und $\Delta CT = \text{mittlere CT}(\text{GOI}) - \text{mittlere CT}(\text{RG})$

Der Nachweis der mRNA-Expression von IL-17, IL-22 und GAPDH in der Milz der Ratte erfolgte unter Verwendung von sowohl fertigen Reagentien (PDAR-Mix für IL-17 und GAPDH) (Applied Biosystems) als auch mit einer selbstgenerierten Sonde und entsprechenden Primern (IL-22). Für diese Versuche wurde das *Fast*-Programm des ABI PRISM 7500 verwendet. Hierfür wurde folgender 10 μ l-Ansatz zusammengegeben und nebenstehendes Programm genutzt:

1 μ l	cDNA (RT-Produkt siehe 2.4.5)	20s	95°C
0,5 μ l	PDAR-Mix (IL-17 bzw. GAPDH)	40 Zyklen:	
5 μ l	Premix Fast	3s	95°C
3,5 μ l	H ₂ O bidest	30s	60°C

alternativ zum PDAR-Mix (bei selbstgenerierten Primern und Sonde für IL-22):

Primer	je 0,2 μ l (Endkonzentration: 200nM)
Sonde	0,2 μ l (Endkonzentration: 250nM)
H ₂ O bidest	3,4 μ l

Die Auswertung und Quantifizierung der mRNA-Expression erfolgte mittels ABI PRISM 7500 System SDS-Software, wobei hier ebenfalls keine klonierten cDNA-Standards verwendet wurden. In diesem Set an Experimenten wurde keine x-fache Induktion berech-

net, da jede Tiergruppe im Einzelnen und unabhängig voneinander betrachtet wurde. Dementsprechend wurde hier nicht der $\Delta\Delta CT$ -Wert verwendet. Die normalisierten CT-Werte (ΔCT) wurden direkt für jedes einzelne Tier als Exponent zur Basis zwei gesetzt, um die Verdopplung der Amplikons pro CT-Wert zu berücksichtigen. Abschließend wurde noch das relative Verhältnis von IL-22 mRNA zur GAPDH mRNA berechnet.

$$IL - 22 \text{ mRNA relativ zu GAPDH} = \frac{1}{2^{\Delta CT}}$$

mit $\Delta CT = \text{mittlere CT(GOI)} - \text{mittlere CT(RG)}$

2.4.7 Auftrennung von Nukleinsäuren im Agarosegel

Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
Bromphenolblau	AppliChem, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

2.4.7.1 RNA-Gelelektrophorese

10x FAE-Puffer	400mM 3-N-Morpholinopropansulfonsäure (MOPS) 100mM Natriumazetat 10mM EDTA pH 8,0
RNA-Gel	1,4g Agarose 72,5ml Aqua bidest 10ml 10x FAE-Puffer 17,9ml Formaldehyd
RNA-Probenpuffer	66% deionisiertes Formamid (v/v) 10% 10x FAE-Puffer (v/v) 8% Formaldehyd (v/v) 0,01% Bromphenolblau (w/v) 0,1mg/ml Ethidiumbromid

Die RNA-Elektrophorese dient der Überprüfung der RNA-Integrität, welche sich durch eine klare Auftrennung der ribosomalen RNA-Untereinheiten (28S, 18S und 5S) bei nicht degradierter RNA auszeichnet. Im Vergleich zur DNA-Elektrophorese ist bei der RNA-Elektrophorese darauf zu achten, dass durch vermehrte Bildung von Sekundärstrukturen eine exakte und reproduzierbare Analyse von RNA nur unter denaturierenden Bedingungen möglich ist. Hierfür wurde ein Puffersystem mit Formaldehyd und Formamid verwendet. 1-3µg RNA wurden vor dem Auftragen für 15min bei 65°C denaturiert. Zur Analyse von RNA wurden 1,5%ige Gele verwendet, wobei als Laufpuffer 1x FAE diente.

2.4.7.2 DNA-Gelelektrophorese

Glycerol	Roth GmbH, Karlsruhe
Molekulargewichtsstandard (DNA) (Gene Ruler 100bp Ladder plus)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Xylencyanol	Merck, Darmstadt
5x DNA-Probenpuffer	20% Glycerin (v/v) 100mM EDTA pH 8,0 0,025% Bromphenolblau (w/v) 0,025% Xylencyanol (w/v)

Um die Identität des PCR-Amplikons zu bestätigen, wurde es zunächst in einem Agarosegel visuell dargestellt. Die angelegte Spannung betrug, je nach Größe des Gels, zwischen 80V und 120V. Die Größe der Fragmente wurde durch einen Größenstandard, der DNA-Fragmente definierter Größe enthielt, bestimmt. Für eine optimale Auftrennung wurde die Konzentration des Gels entsprechend der Größe des DNA-Fragmentes gewählt (0,8% für Fragmente >2-3kb; 1,5-2,0% für kleinere Fragmente). Die Agarose wurde unter Erwärmung in 1x TBE gelöst und mit 500ng/ml Ethidiumbromid versetzt. Als Laufpuffer diente ebenfalls 1x TBE.

2.4.8 DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Nach Auftrennung der DNA mittels Agarosegel wurde die Bande, die das gewünschte DNA-Fragment enthielt, unter Verwendung von UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten. Die in dem Gelstück enthaltene DNA konnte mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers isoliert werden.

2.4.9 Sequenzierung von DNA

BigDye-Terminatoren

Applied Biosystems, Darmstadt

Hi-Di-Formamid

Applied Biosystems, Darmstadt

Um die Identität des PCR-Amplikons zu verifizieren, wurde es anschließend basierend auf der Didesoxy-Methode nach Sanger [248] sequenziert (ABI PRISM 310 Genetic Analyser, Applied Biosystems).

Die Sequenzierung wurde nach Angaben des Herstellers mit PCR-abhängigen Primern (siehe Anhang) durchgeführt. Für die Sequenzierung wurde folgender 10µl-Ansatz zusammengegeben und nebenstehendes Programm durchgeführt:

1-3µl PCR-Produkt	25 Zyklen	
2µl BigDye-Terminatoren	10s	96°C
1µl Sequenzierprimer [5µM]	5s	55°C
4-6µl H ₂ O bidest	2min	60°C

Die Aufarbeitung des PCR-Produkts erfolgte nach Angaben des Herstellers mit abschließender Aufnahme in 18µl Hi-Di-Formamid.

2.5 Proteinbiochemische Techniken

2.5.1 Isolierung von Proteinen

2.5.1.1 Gesamtproteinzellextrakte

Lysis-Puffer	25mM Tris pH 7,4
	150mM NaCl
	1mM CaCl ₂
	1% Triton X-100 (v/v)
	1x Proteinaseinhibitor-Cocktail
	1mM PMSF
	1mM DTT
	20mM NaF
	1mM Na ₃ VO ₄

Für die Gewinnung von Gesamtproteinzellextrakten wurden die adhärenenten Zellen in 1ml eiskaltem 1x PBS vom Plattenboden abgeschabt, in ein 1,5ml-Reaktionsgefäß überführt und zentrifugiert (Biofuge fresco; 5min; 2000rpm; 4°C). Das Zellpellet wurde in einem angemessenen Volumen Lysispuffer (50-150µl) aufgenommen. Nach einer Inkubation auf Eis wurden die Lysate zentrifugiert (10min; 13.000rpm; 4°C) und der Überstand, welcher die Gesamtproteinzellextrakte enthielt, in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

2.5.1.2 Nukleäre Extrakte

Puffer A	10mM HEPES pH 7,9
	10mM KCl
	0,1mM EDTA
	0,1mM EGTA
	1mM DTT
	0,5mM PMSF

Puffer C	20mM HEPES 0,4M NaCl 1mM EDTA 1mM EGTA 25% Glycerin (v/v) 1mM DTT 0,5mM PMSF
NP-40 (Igepal CA-630)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Für die Isolierung von Kernproteinen wurden die adhärenenten Zellen einmal mit kaltem 1x PBS gewaschen und in 1ml kaltem 1x PBS/0,1mM EDTA pH 8,0 vom Plattenboden abgeschabt, in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und zentrifugiert (Biofuge fresco; 1min; 5000rpm; 4°C). Das Pellet wurde in 300µl Puffer A resuspendiert und für 15min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 20µl NP-40 zugegeben und gut vermischt. Nach einer Zentrifugation (1min; 13.000rpm; 4°C) wurde der Überstand abgenommen. Dieser enthielt die zytosolischen Proteine. Das Pellet wurde in 70µl Puffer C resuspendiert und bei 4°C für 20min und 1400rpm (Schüttler) geschüttelt. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert (20min; 13.000rpm; 4°C). Im Überstand befanden sich die Kernproteine, welche aliquotiert und bei -80°C eingefroren wurden.

2.5.1.3 TCA-Fällung zur Isolation sezernierter Proteine im Zellkulturüberstand

IL-18BP_a wird von DLD-1 Zellen nach Stimulation mit IFN_γ sezerniert und in das Medium abgegeben. Um dieses Protein im Western Blot nachweisen zu können (siehe Kapitel 2.5.3 und 2.5.4), wurden Zellkulturüberstände (5ml/10cm-Schale) mit 1/10 Volumen 70% Trichloressigsäure (TCA; *trichloroacetic acid*) präzipitiert. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis wurden die 5ml Zellkulturüberstand gestaffelt in einem Eppendorf- Reaktionsgefäß zentrifugiert (Biofuge fresco; 30min; 13.000rpm; 4°C). Das Pellet wurde mit Aceton gewaschen und in SDS-Probenpuffer (siehe Kapitel 2.5.3) resuspendiert. Anschließend erfolgte die Auftrennung in einem 10%igen Polyacrylamidgel (siehe Kapitel 2.5.3) und der Nachweis mittels Western Blot (siehe Kapitel 2.5.4).

2.5.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Roti-Nanoquant (5x)

Roth GmbH, Karlsruhe

Bei der Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford [249] nutzt man die Verschiebung des Absorptionsmaximums von *Coomassie brilliant blue* bei der Bindung an Proteine von 465nm zu 595nm. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde eine BSA-Eichgerade von 0-100µg/ml BSA erstellt. Proteinextrakte wurden in der Regel 1:100 verdünnt. Zu je 50µl Proteinlösung wurden 200µl 1x Nanoquant in eine 96-Loch-Platte hinzupipettiert und die Absorption bei einer Wellenlänge von 595nm mit Hilfe des Microplate Reader Sunrise (Tecan Trading AG) gemessen.

2.5.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Rotiphorese Gel 30 (Acrylamid/Bisacrylamid 37,5 :1)

Roth GmbH, Karlsruhe

Ammoniumperoxodisulfat (APS)

Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Bromphenolblau

AppliChem, Darmstadt

Glycerol

Roth GmbH, Karlsruhe

β-Mercaptoethanol

Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Molekulargewichtsstandard (Protein)

MBI Fermentas, St. Leon-Rot

(Page Ruler Prestained Protein Ladder)

Tetramethylethyldiamin (TEMED)

Roth GmbH, Karlsruhe

Trenngelpuffer (4x)

1,5M Tris/HCl pH 8,8

0,5% SDS (v/v)

Sammelgelpuffer (4x)

1M Tris/HCl pH 6,8

0,5% SDS (v/v)

SDS-Laufpuffer (10x PAGE)

250mM Tris

2,5M Glycin

1% SDS (v/v)

pH 8,3

SDS-Probenpuffer

62mM Tris/HCl pH 6,8
2% SDS (v/v)
5% β -Mercaptoethanol (v/v)
10% Glycerol (v/v)
0,0025% Bromphenolblau (w/v)

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen erfolgte nach Zugabe des SDS-Probenpuffers und kurzem Erhitzen bei 95°C in SDS-Polyacrylamidgelen nach Lämmli [250]. Die Proteine erlangten durch das im SDS-Probenpuffer enthaltene SDS (*sodium dodecyl sulfate*) eine negative Ladung, die sich proportional zum Molekulargewicht verhält. Zur Reduktion von Disulfidbrücken wurde zusätzlich β -Mercaptoethanol zugegeben. Da nach der Denaturierung Strukturunterschiede weitgehend aufgehoben sind, erfolgte die Auftrennung im elektrischen Feld nach dem Molekulargewicht. Nach der Denaturierung bei 95°C für 5min wurden in Abhängigkeit vom nachzuweisenden Protein 50-100 μ g Gesamtprotein auf ein SDS-Polyacrylamidgel geeigneter Konzentration aufgetragen. Die diskontinuierliche Elektrophorese bestand dabei aus einem 4%igen Sammelgel und einem Trenngel mit 8% oder 10% Polyacrylamid (siehe Tabelle 2.1). Die Auftrennung erfolgte in 1x SDS-Laufpuffer bei 140V für etwa 2h.

	Trenngel		Sammelgel	
	8%	10%	4%	
Wasser	2,3	2,0	3,5	Wasser
Rotiphorese Gel 30	1,3	1,7	0,83	Rotiphorese Gel 30
1,5M Tris/HCl (pH 8,8)	1,3	1,3	0,63	1M Tris/HCl (pH 6,8)
10% APS	0,05	0,05	0,05	10% APS
TEMED	0,003	0,002	0,005	TEMED

Tabelle 2.1 Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese. (Angaben in ml)

2.5.4 Semi-Dry Western Blot und Proteindetektion mittels Antikörpern

Ponceau S

Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Magermilchpulver (Trockenmilch)

Merck, Darmstadt

Rinderserumalbumin Fraktion V (BSA)

AppliChem, Darmstadt

Transferpuffer	48mM Tris pH 9,2 39mM Glycin 20% Methanol (v/v) 0,037% SDS (v/v)
10x TBST	100mM Tris 0,5% Tween 20 (v/v) 1,5M NaCl pH 8,0

Mittels Western Blot-Analyse konnte in der vorliegenden Arbeit extrazelluläres IL-18BPα sowie die intrazellulären Proteine iNOS, pSTAT1/STAT1, pSTAT3/STAT3 und βTubulin nachgewiesen werden. Hierfür wurden die aufgetrennten Proteine nach einer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit Hilfe von Antikörpern nachgewiesen. Der Blot wurde luftblasenfrei wie folgt zusammengesetzt: Kathode, 3 Whatman-Papiere, Proteingel, NC-Membran, 3 Whatman-Papiere und Anode. Sowohl die Whatman-Papiere als auch die Membran wurden vorher in Transferpuffer angefeuchtet. Der Transfer erfolgte bei $0,8\text{mA}/\text{cm}^2$ für 45-90min je nach Proteingröße (Hoefer SemiPhor TE77, Amersham Pharmacia). Die Qualität des Transfers wurde durch reversibles Färben der Membran mit Ponceau S kontrolliert.

Zur Absättigung unspezifischer Bindungen wurde die Membran vor Zugabe des Primärantikörpers mit entsprechender Blockierlösung (siehe Kapitel 2.1.4) für 1h bei RT inkubiert (alle weiteren Schritte wurden, wenn nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur ausgeführt). Nach dem Waschen mit 1x TBST (3x 5min) wurde die Membran mit dem entsprechenden Primärantikörper (siehe Kapitel 2.1.4) über Nacht bei 4°C auf dem Schüttler inkubiert. Es folgten ein erneutes Waschen mit 1x TBST (3x 5min) und eine Inkubation für 1h mit dem entsprechenden Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper (siehe Kapitel 2.1.4). Vor der Substratzugabe wurde die Membran erneut gewaschen (3x 5min mit 1x TBST). Die Peroxidase setzt das Substrat (Luminol) um und das dabei emittierte Licht konnte mit einem Röntgenfilm nachgewiesen werden. Die Membran wurde dazu nach Angaben des Herstellers mit dem ECL-Detektionssystem (GE Healthcare) behandelt und für 1min inkubiert. Ein aufgelegter Röntgenfilm wurde je nach Bedarf nach einer Expositionszeit von 30 Sekunden bis 2 Stunden entwickelt.

Um die erneute Hybridisierung einer Membran zu ermöglichen, mussten zuvor die gebundenen Antikörper entfernt werden. Hierzu wurde die Membran in 0,2N NaOH für 10min bei

RT dehybridisiert. Anschließend wurde die Membran mit 1x TBST gewaschen (3x 5min) und konnte nun erneut hybridisiert werden.

2.5.5 Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA)

Bindungspuffer	0,1M Natriumkarbonatpuffer pH 9,5
Blockierlösung	1x PBS 10% FKS (v/v)
Waschpuffer (PBST)	1x PBS 0,05% Tween 20 (v/v)
Substrat (Tetramethylbenzidin, TMB)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Stop-Lösung	2N H ₂ SO ₄

Der ELISA ist eine sensitive Methode zur Immundetektion sezernierter Proteine. In der vorliegenden Arbeit wurde der ELISA verwendet, um die Quantität verschiedener Proteine in Zellkulturüberständen von DLD-1 Zellen (CXCL-10 / IP-10) oder PBMC (IL-22) sowie im Plasma von Ratten (IL-6, IL-18, IL-22, MIP-2 α , TNF α) und im Serum von Sepsispatienten (IL-22) zu bestimmen. Dabei können Antigene, die in niedrigsten Konzentrationen vorliegen, quantifiziert werden. Die hier angewandten ELISA-Kits (siehe Kapitel 2.1.5) beruhen auf dem Sandwich-Prinzip und wurden nach Angaben der Hersteller durchgeführt.

2.5.6 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

[γ - ³² P]-ATP [6000Ci/mmol]	GE Healthcare, München
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
PNK-Puffer	Roche, Mannheim
poly [d(I-C)] [1mg/ml]	Roche, Mannheim
Rotiphorese Gel 30 (Acrylamid/Bisacrylamid 37,5 :1)	Roth GmbH, Karlsruhe
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Roth GmbH, Karlsruhe

T4 Polynukleotid-Kinase [10U/ μ l]	Roche, Mannheim
10x TEN-Puffer	100mM Tris 10mM EDTA 1M NaCl pH 7,5
3x EMSA-Puffer	12% Ficoll (v/v) 60mM HEPES pH 7,9 150mM KCl 3mM EDTA pH 8,0 3mM DTT 0,75mg/ml BSA
EMSA-Fixierer	100ml/l Isopropanol 100ml/l Eisessig

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der EMSA für die Untersuchung potentiell aktiver Transkriptionsfaktoren, in diesem Falle NF κ B, im Zellkern verwendet. Der EMSA ist eine Standardmethode zur Identifizierung und Charakterisierung von Protein-DNA-Komplexen. Hierzu wird eine radioaktiv markierte DNA-Sonde mit Kernproteinextrakten (siehe Kapitel 2.5.1.2) inkubiert und die entstandenen Protein-DNA-Komplexe werden in einem nativen Polyacrylamidgel analysiert. Die Auswertung der *bandshift*-Analyse erfolgt nach Autoradiographie des getrockneten Gels. Neben dem Signal der nicht komplexierten DNA-Sonde tritt bei der Ausbildung eines Protein-DNA-Komplexes eine zusätzliche Bande mit deutlich verändertem Laufverhalten auf (*bandshift*). Daraus ergibt sich eine Retardation der radioaktiv markierten Sonde, wenn diese ein Protein gebunden hat. Dieser *bandshift* kann mit Hilfe von Antikörpern näher charakterisiert werden (*supershift*).

Zur Herstellung einer radioaktiv markierten Oligonukleotidsonde wurde folgender Ansatz von 20 μ l verwendet:

4 μ l doppelsträngiges Oligonukleotid [20pmol] (siehe Anhang)
2 μ l PNK-Puffer
1 μ l T4 Polynukleotid-Kinase [10U/ μ l]
5 μ l [γ ³²P]-ATP [6000Ci/mmol]
8 μ l H₂O

Es folgte eine Inkubation von 30min bei 37°C mit anschließender Inkubation von 10min bei 75°C. Die markierte Sonde wurde anschließend mit einer Nick-Säule nach Angaben des Herstellers aufgereinigt, um nicht eingebautes [$\gamma^{32}\text{P}$]-ATP zu entfernen. Dabei wurde 1x TEN-Puffer verwendet. 2µl des Eluats wurden zur Bestimmung der Aktivität im TRI-CARB 2100 TR β -counter (Canberra-Packard) vermessen. Für die Bindung von Proteinen an die markierte Oligonukleotidsonde wurde folgender Ansatz verwendet:

7,5µg nukleärer Proteinextrakt (siehe Kapitel 2.5.1.2)
6,7µl 3x EMSA-Puffer
1,25µl poly [d(I-C)] [1mg/ml]
gegebenenfalls Zugabe von 1µg Antikörper (bei *supershift*-Analysen)
ad 20µl Puffer C (siehe Kapitel 2.5.1.2)

Nach einer Inkubation von 30min bei RT wurde die markierte Sonde (50.000cpm) zugegeben und für 45min auf Eis inkubiert. Es folgte eine native Gelelektrophorese. Dabei wurde ein kontinuierliches Puffersystem mit einem 4,5%igen Polyacrylamidgel (siehe Tabelle 2.2) verwendet. Als Laufpuffer diente 0,5x TBE. Unter diesen Niedrigsalzbedingungen wurden auch schwache Wechselwirkungen toleriert. Die Proteine wurden bei 200V für 1,5 – 2h aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel fixiert, auf Whatman-Papier getrocknet und nach Exposition auf einen Imager-Screen im Phosphorimager elektronisch abgebildet.

	4,5%
Wasser	29,0
Rotiphoese Gel 30	5,4
10x TBE-Puffer	1,8
10% APS	0,4
TEMED	0,03

Tabelle 2.2 Zusammensetzung des nativen Polyacrylamidgels zur Analyse der Protein-DNA-Komplexe im EMSA. (Angaben in ml)

2.5.7 Luciferase-Reportergen-Assay

In der vorliegenden Arbeit wurden Luciferase-Reportergen-Assays zur Untersuchung des humanen iNOS-Promtors verwendet. Zunächst wurden DLD-1 Zellen untersucht, welche durch eine stabile Transfektion die *Photinus pyralis* (Firefly)-Luciferase überexprimieren. Dieses Enzym katalysiert die Oxidation von Luciferin unter der Freisetzung eines Photons. Mit Hilfe eines Luminometers lässt sich diese Biolumineszenz in RLU (*relative light units*) messen. Die Firefly-Luciferase steht dabei unter der Kontrolle eines 16kb-iNOS-Promotor-

konstrukt (DLD-1/pXP₂-16kb) (siehe Kapitel 2.3.2). In diesen Zellen diente der Proteingehalt der Extrakte zum Abgleich der Luciferase-Aktivität. Für die Messung wurde das Luciferase Assay System von Promega verwendet. Die Aktivitätsbestimmung erfolgte nach Angaben des Herstellers im AutoLumat LB953 (Berthold).

Für die weitere Charakterisierung potentieller Regulationsmechanismen der iNOS-Expression wurden parentale DLD-1 Zellen in einem zweiten Versuchsansatz mit pRL-TK und pGAS-Luc oder pCIS-CK kotransfiziert (siehe Kapitel 2.3.5.2). pGAS-Luc ist ein induzierbares Reporterplasmid, in welchem die Expression des (*Firefly*) Luciferase-Reportergens über ein basales Promotorelement (TATA-Box) und ein *cis*-GAS-Element kontrolliert wird. Als negatives Kontrollplasmid mit fehlendem *cis*-Element dient pCIS-CK. Als zusätzliches Kontrollplasmid wurde pRL-TK verwendet, welches unter der Kontrolle des Promotors der Thymidinkinase des Herpesvirus für eine konstante Expression der *Renilla reniformis*-Luciferase kodiert. Die Expression der *Renilla*-Luciferase wurde zum Abgleich der *Firefly*-Luciferase verwendet. Die Aktivität beider Luciferase-Reportergene wurde mit dem Dual Luciferase Reporter Assay System (Promega) ermittelt, welches für die simultane Messung der *Firefly*- und *Renilla*-Luciferase im AutoLumat LB953 (Berthold) geeignet ist. Beide Enzyme emittieren bei unterschiedlichen Wellenlängen. Die Behandlung der Zellen erfolgte hierbei nach Angaben des Herstellers.

2.5.8 Bestimmung der iNOS-Aktivität (Griess-Assay)

Griess-Ilosvays-Reagenz

Merck, Darmstadt

Um die Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) in DLD-1 Zellen nachzuweisen, wurde Nitrit als ein stabiles Endprodukt des NO-Stoffwechsels gemessen. Dafür wurden in einer 96-Loch-Platte Zellkulturüberstände und Griess-Reagenz zu gleichen Teilen vermischt. Die Absorption wurde anschließend bei 540nm im Microplate Reader Sunrise (Tecan Trading AG) vermessen. Die Nitritkonzentrationen wurden anhand einer NaNO₂-Standardkurve berechnet.

2.6 Tierexperimentelle Methoden

Aqua ad injectabilia

B. Braun, Melsungen

Dexamethason-21-phosphat-dinatriumsalz	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
RNA/ <i>later</i> Tissue collection (RNA-Stabilisierungslösung)	Ambion/Applied Biosystems, Cambridgeshire, UK

Alle Tierversuche wurden durch das Regierungspräsidium Darmstadt (V54-19c20/15-F143/12) genehmigt und gemäß den ethischen Grundsätzen für Tierversuche (NIH guidelines, National Academy of Sciences, Washington DC, 1996) durchgeführt.

2.6.1 Tiere und Anästhesie

Die Tierversuche wurden unter Anleitung und Mithilfe von Dr. Patrick Scheiermann (Klinik für Anästhesiologie; Universitätsklinikum München) durchgeführt. Vierzehn männliche Sprague-Dawley Ratten (Harlan-Winkelmann, Borcheln) mit einem Durchschnittsgewicht von 507 ± 12 g wurden in einem 12h Tag / 12h Nacht-Rhythmus bei 22°C und freiem Zugang zu Nahrung und Wasser gehalten. Die Tiere wurden durch eine intraperitoneale (i.p.) Injektion von Pentobarbital (10mg/kg Körpergewicht (KG); Narcoren, Halbergmoos) und Fentanyl (0,05mg/kg KG; Jansen-Cilag, Neuss) narkotisiert. Die bewusstlosen Ratten wurden auf die notwendige Narkosetiefe hin getestet, gewogen und in Rückenlage auf die vorgeheizte OP-Platte gelegt und mit Pflastern an den Extremitäten fixiert. Nach einer Tracheotomie wurde eine 13-G Kanüle (Abbot, Wiesbaden) endotracheal eingeführt. Anschließend wurden die Tiere sofort mit einem Neugeborenenbeatmungsgerät (Stephanie; Stephan, Gackenbach) druckkontrolliert beatmet (inspiratorisches O₂-Volumen: 0,21; T_{I/E} 1:2; p_{max} 20cm H₂O; PEEP (positiver endexpiratorischer Druck) 4cm H₂O; Atemzugvolumen 16-20ml/kg; Atemfrequenz 31/min). Diese Werte wurden zur Erhaltung der Normokapnie angepasst. Die arterielle Blutgasanalyse (BGA; ABL500 Radiometer, Willich) erfolgte stündlich über flüssigkeitsgefüllte Polyurethankatheter (SIMS Portex, Hythe, UK) in der rechten Arteria femoralis. Ein zweiter Katheter wurde in die Vena femoralis zur kontinuierlichen Infusion von 0,9% NaCl (12ml/kg/h; B. Braun, Melsungen), Pentobarbital (0,6mg/kg/h) und Fentanyl (0,03mg/kg/h) eingeführt. Die Körpertemperatur wurde über eine rektale Sonde gemessen.

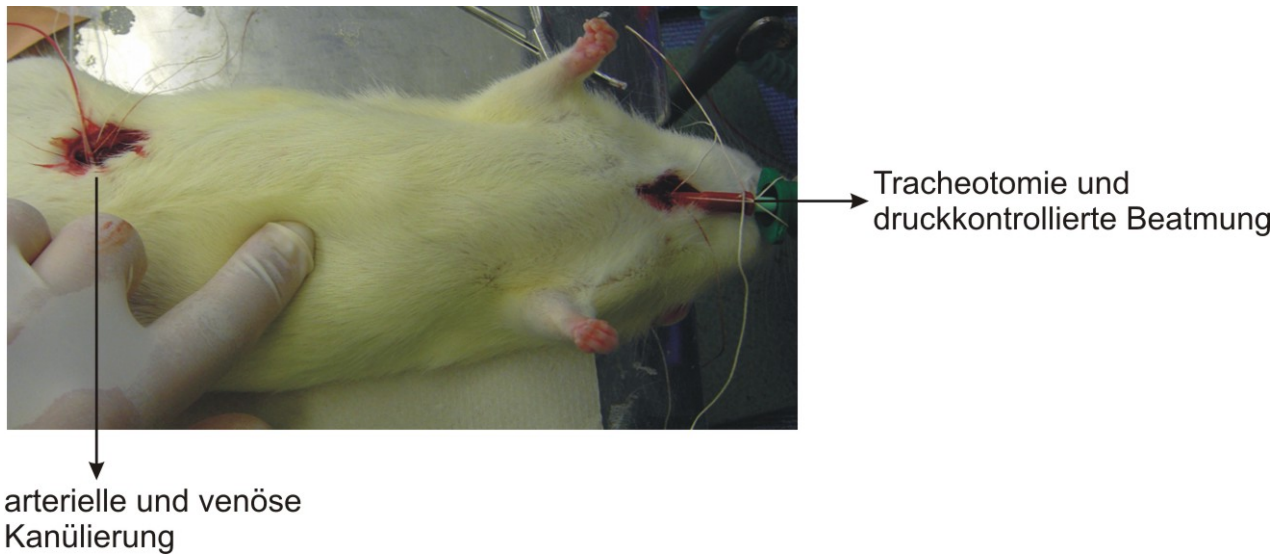


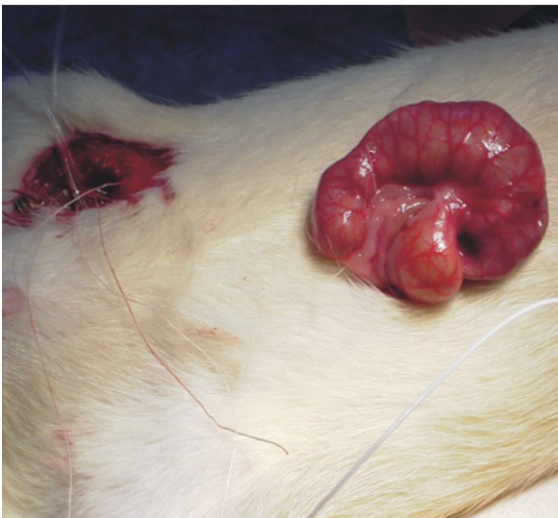
Abbildung 2.1 Tracheotomie und arterielle/venöse Kanülierung. Die Ratten wurden in Rückenlage auf die vorgeheizte OP-Platte gelegt und mit Pflastern an den Extremitäten fixiert. Nach einer Tracheotomie wurde eine 13-G Kanüle endotracheal eingeführt. Anschließend wurden sie sofort mit einem Neugeborenenbeatmungsgerät druckkontrolliert beatmet. Die arterielle Blutgasanalyse erfolgte stündlich über flüssigkeitsgefüllte Polyurethankatheter in der rechten Arteria femoralis. Ein zweiter Katheter wurde in die Vena femoralis zur kontinuierlichen Infusion von 0,9% NaCl, Pentobarbital und Fentanyl eingeführt.

2.6.2 Ligation und Inzision des Caecum

Die Ratten wurden zufällig in zwei Gruppen mit je sieben Tieren eingeteilt. Zusätzlich wurden Plasmaproben von 14 weiteren männlichen Sprague-Dawley Ratten aus einer früheren Studie verwendet (Sham-Gruppe und CLI-Gruppe; jeweils $n=7$) [251]. Nach Messung der basalen Blutgase erhielten die Tiere entsprechend ihrer Gruppeneinteilung intravenös (i.v.) Dexamethason-21-phosphat-dinatriumsalz (CLI/Dexa-Gruppe; 5mg/kg KG à 250µl; Sigma-Aldrich, Taufkirchen) oder Aqua ad injectabilia (CLI/Wasser-Gruppe; 250µl; B. Braun, Melsungen). Die Tiere der Sham- bzw. CLI-Gruppe erhielten zu diesem Zeitpunkt keine Medikamente bzw. Zusätze. Anschließend wurde bei allen Tieren ein 2cm langer paramedianer Bauchschnitt (Laparotomie) gesetzt. Das Caecum wurde vorsichtig mit einem mit 0,9% NaCl getränkten Wattestäbchen herausgenommen. In der Sham-Gruppe wurde das Caecum nach behutsamer Manipulation direkt zurück in das Abdomen gelegt. In den anderen drei Gruppen (CLI-Gruppe, CLI/Dexa-Gruppe und CLI/Wasser-Gruppe) wurde das Caecum dagegen zusammen mit den Blutgefäßen im Mesenterium unterhalb der Valva ileocaecalis ligiert (2/0-Mersilene; Ethicon, Norderstedt). Dadurch wurde einerseits die physiologische Darmpassage nicht unterbrochen und andererseits ein

späteres Verbluten verhindert. Anschließend wurde das ligierte Caecum auf der dem Mesenterium gegenüberliegenden Seite ca. 1,5cm eingeschnitten (*caecum ligation and incision*, CLI) [251]. Das Caecum wurde dann vorsichtig in das Abdomen zurückgeschoben. Zum Ausgleich des Flüssigkeitshaushaltes wurden 2ml/kg 0,9% NaCl in das Abdomen geträufelt, bevor die Bauchdecke in zwei Lagen wieder vernäht wurde (3/0-Vicryl; Ethicon, Norderstedt).

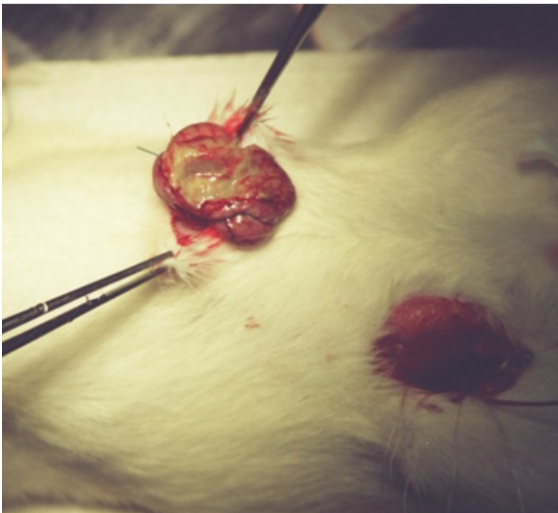
A



B



C



D



Abbildung 2.1 Ligation und Inzision des Caecum. (A) Es wurde ein 2cm langer paramedianer Bauchschnitt (Laparotomie) gesetzt. Das Caecum wurde vorsichtig mit einem mit 0,9% NaCl getränkten Wattestäbchen herausgenommen und (B) zusammen mit den Blutgefäßen im Mesenterium unterhalb der Valva ileocaecalis ligiert. (C) Anschließend wurde das ligierte Caecum auf der dem Mesenterium gegenüberliegenden Seite ca. 1,5cm eingeschnitten (*caecum ligation and incision*, CLI). Das Caecum wurde dann vorsichtig in das Abdomen zurückgeschoben. (D) Abschließend wurde die Bauchdecke in zwei Lagen vernäht.

Der mittlere arterielle Blutdruck, der arterielle Basenüberschuss und der arterielle pH-Wert wurden stündlich über den gesamten Beobachtungszeitraum von 390min gemessen. Am Ende der Beobachtungszeit oder im Falle eines frühzeitigen Todes wurden alle Tiere durch Herzblutentnahme ausgeblutet. Dafür wurden heparinisierte Spritzen verwendet (Heparin-Natrium; Ratiopharm, Ulm). Das Blut wurde zentrifugiert (Megafuge 1.0; 1500rpm; 15min), aliquotiert (Plasma) und bei -80°C gelagert. Nach einer *post mortem*-Laparotomie wurden Teile von Leber, Lunge und Milz entnommen und für 24h zur Stabilisierung der RNA in *RNAlater tissue collection* bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde die Lösung wieder entfernt und die Gewebe auf Stickstoff eingefroren, um sie dann bei -80°C zu lagern. Für weitere Experimente wurde die RNA aus der Milz isoliert (siehe Kapitel 2.4.2).

2.7 Patienten mit Peritonitis-bedingter Sepsis und Kontrollgruppen

2.7.1 Patienten mit Peritonitis-bedingter Sepsis

Das Studienprotokoll sowie die Einverständniserklärung der Patienten wurden durch die Ethikkommission des Universitätsklinikums der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt akzeptiert und bewilligt. Die Studie umfasst 16 chirurgische Patienten (5 ♀, Ø Alter: 62,4 Jahre und 11 ♂, Ø Alter: 63,6 Jahre). Nach der Diagnose einer abdominalen Sepsis erfolgte die Einweisung auf die Intensivstation des Universitätsklinikums. Die Patienten (Ø SOFA-Index: 13,0; Ø SAPSII-Index: 57,9) erfüllten die Konsensuskriterien einer schweren Sepsis und 15 der 16 Patienten zeigten die Symptome eines septischen Schocks. Hierbei beschreibt der SOFA-Index (*sepsis-related organ failure assesement*) den Grad der Organdysfunktion bzw. des Organversagens [252]. Der SAPSII-Index (*simplified acute physiology score II*) ist eine Schweregrad-Klassifikation und charakterisiert den Gesundheitszustand des Patienten [253]. Das 28-Tage-Überleben betrug 43,8% und 25% überlebten drei Monate und mehr. Als Einschlusskriterien galten die Diagnose einer abdominalen Sepsis sowie erste Symptome einer Sepsis-induzierten Organdysfunktion innerhalb der letzten 24h. Bei allen Patienten entwickelte sich die Sepsis aufgrund eines primären chirurgischen Eingriffs während ihres aktuellen Kranken-

hausaufenthaltes (13 Tumoreingriffe, 1 Mesenterialinfarkt, 1 Überrolltrauma, 1 Cholezystektomie). Zur Analyse der Serumzytokine und des I-FABP wurde peripheres Blut entweder direkt vor der chirurgischen Herdsanierung oder, in Fällen, wo ein späterer Eingriff nicht indiziert war, bei Einschluss in die Intensivstation mit einer S-Monovette (Serum; #05.1104; Sarstedt, Nümbrecht) abgenommen. Das Blut wurde für 10min bei RT und 1500rpm zentrifugiert. Anschließend wurde das Serum aliquotiert und bei -80°C gelagert.

2.7.2 Kontrollgruppen

Die erste Gruppe umfasst 21 gesunde Donoren (7 ♀, Ø Alter: 32,9 Jahre und 14 ♂, Ø Alter: 33,5 Jahre). Die zweite Gruppe bilden neun Patienten (2 ♀, Ø Alter: 59,0 Jahre und 7 ♂, Ø Alter: 64,1 Jahre), welche einer modifizierten Whipple-Operation unterzogen wurden. Dabei handelt es sich um einen komplizierten Eingriff zur Entfernung von Teilen des Pankreas und des Duodenums sowie des Magenantrums als Folge eines Pankreaskopfkarzinoms. Bei dieser Gruppe wurde keine Sepsis diagnostiziert und das periphere Blut ist 24h nach dem Eingriff entnommen worden. Das Blut beider Gruppen wurde für 10min bei RT und 1500rpm zentrifugiert. Anschließend wurde das Serum aliquotiert und bei -80°C gelagert.

3 Ergebnisse

3.1 IL-22 vermittelt über STAT3 die Induktion der iNOS-Expression in humanen epithelialen Kolonkarzinomzellen

Wie in Kapitel 1 beschrieben, wirkt Interleukin (IL)-22 ausschließlich auf lokal residierende Zellen wie Hepatozyten, Keratinozyten oder epitheliale Zellen des Kolons und der Lunge (siehe Kapitel 1.2.3). Da die epithelialen DLD-1 Kolonkarzinomzellen als ein sehr gut charakterisiertes Zellkulturmodell zur Analyse der humanen induzierbaren NO-Synthase (iNOS) im Zusammenhang mit proinflammatorischen Zytokinen gelten, wurden die Untersuchungen zur Rolle von IL-22 bei der Regulation der iNOS schwerpunkthaft an DLD-1 Zellen durchgeführt.

3.1.1 DLD-1 Kolonkarzinomzellen reagieren responsiv auf IL-22

Zu Beginn musste geklärt werden, ob DLD-1 Zellen den notwendigen Rezeptorkomplex bestehend aus den Ketten IL-22R1 und IL-10R2 ausbilden. Dieser Komplex ist für die Bindung von IL-22 essentiell, um intrazelluläre Signalkaskaden zu induzieren (siehe Kapitel 1.2.3). Dafür wurde die mRNA-Expression der beiden Rezeptorketten IL-22R1 und IL-10R2 überprüft. Unter Verwendung der RT-PCR konnte die mRNA beider Rezeptorketten in unstimulierten DLD-1 Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 3.1). Dabei dienten HaCaT Keratinozyten als Positivkontrolle sowohl für IL-22R1 als auch für IL-10R2 [47]. Im Vergleich dazu wurden monozytäre THP-1 Zellen als Positivkontrolle für IL-10R2 und als Negativkontrolle für IL-22R1 verwendet [49].

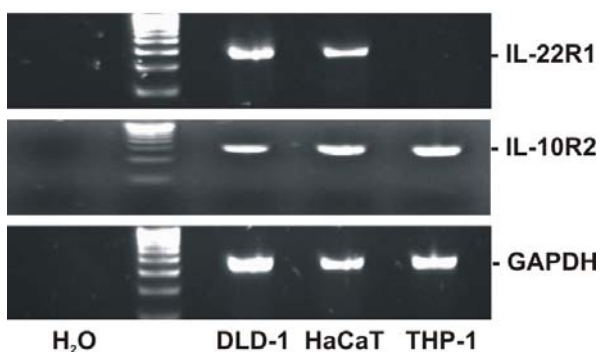


Abbildung 3.1 DLD-1 Kolonkarzinomzellen exprimieren den IL-22-Rezeptorkomplex. Aus unstimulierten DLD-1 Zellen, HaCaT Keratinozyten und monozytären THP-1 Zellen wurde die RNA isoliert und mittels RT-PCR auf die Expression der Rezeptorketten IL-22R1 und IL-10R2 hin untersucht.

Im nächsten Schritt sollte die biologische Aktivität des Rezeptorkomplexes nach Stimulation mit IL-22 überprüft werden. Als Marker für die Funktionalität des Rezeptorkomplexes wurde die Phosphorylierung und die daraus resultierende Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT3 genutzt, welches in der Literatur als prominentes Signalmolekül in der Signaltransduktion von IL-22 beschrieben wird. Dafür wurden DLD-1 Zellen für 10min, 30min und 2h mit IL-22 (20ng/ml) stimuliert. Die Proteinlysate wurden anschließend über eine Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt und phosphoryliertes (p)STAT3 konnte nachfolgend im Western Blot detektiert werden. Abbildung 3.2 A zeigt, dass in DLD-1 Zellen bereits nach 10min eine deutliche Phosphorylierung und damit Aktivierung von STAT3 durch IL-22 nachgewiesen werden kann. Im Gegensatz dazu hat eine Stimulation der DLD-1 Zellen mit IFN γ (10ng/ml) keine STAT3-Aktivierung zur Folge (Abbildung 3.2 B), wobei eine Kostimulation der DLD-1 Zellen mit IL-22 (20ng/ml) und IFN γ (10ng/ml) den Einzeleffekt von IL-22 nicht verstärken kann.

In einem zusätzlichen Versuch resultierte die Transfektion der DLD-1 Zellen mit einer spezifischen STAT3-siRNA in einer massiven Reduktion der STAT3-Expression sowie der Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors nach Stimulation mit IL-22 (20ng/ml) und IFN γ (10ng/ml) in Kombination (Abbildung 3.2 C). Diese Daten bewiesen auch die außerordentliche Effektivität der STAT3-siRNA, welche in späteren Experimenten nochmals Verwendung fand (siehe Kapitel 3.1.3).

Im Weiteren wurde der Einfluss von IL-22 auf STAT1 untersucht. Hierfür wurden DLD-1 Zellen für 30min und 1h mit IL-22 (20ng/ml) bzw. IFN γ (10ng/ml) als Einzelstimulus oder in Kombination stimuliert. Das Ergebnis in Abbildung 3.2 D verdeutlicht, dass IL-22 nach 30min die Phosphorylierung von STAT1 im Vergleich zu IFN γ nur unwesentlich induzieren konnte und nach 1h war das Signal bereits nicht mehr zu detektieren.

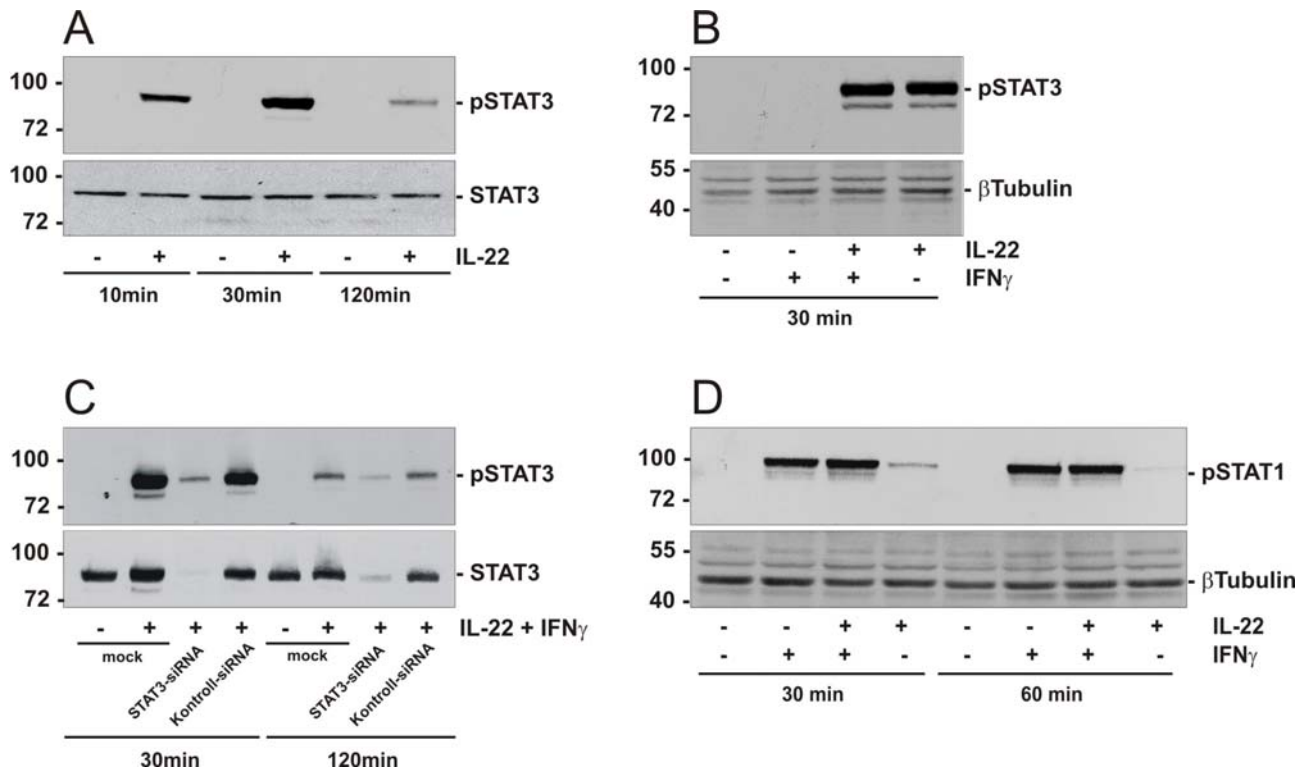


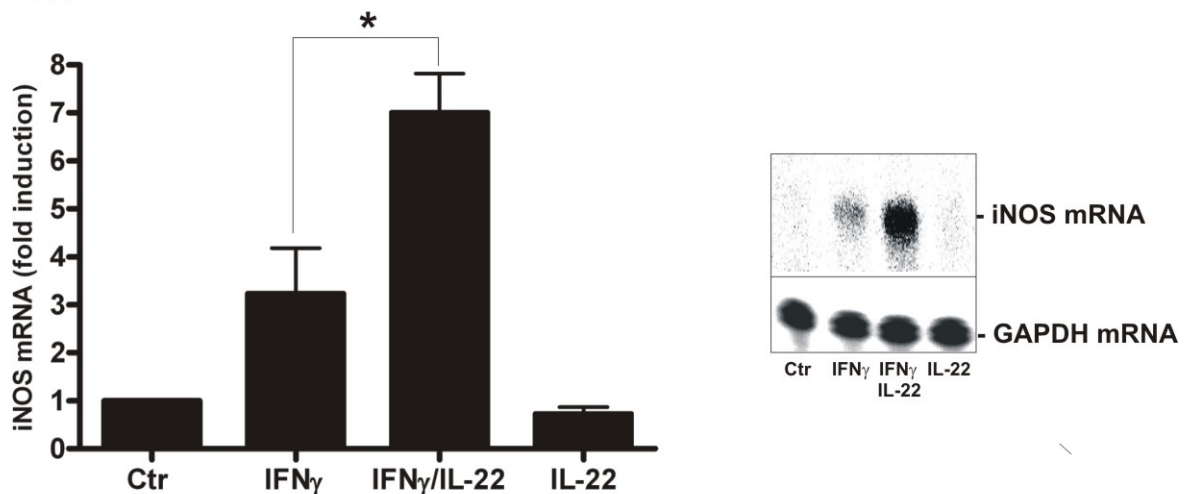
Abbildung 3.2 DLD-1 Kolonkarzinomzellen reagieren responsiv auf IL-22. (A) DLD-1 Zellen wurden für 10min, 30min, und 2h mit IL-22 (20ng/ml) stimuliert. Der zelluläre phospho-(p)STAT3-Gehalt wurde anschließend im Western Blot analysiert. Für die Detektion von Gesamt-STAT3 wurde die NC-Membran nachfolgend gestrippt. **(B)** DLD-1 Zellen wurden für 30min mit IL-22 (20ng/ml) bzw. IFN γ (10ng/ml) als Einzelstimulus oder in Kombination stimuliert. Der zelluläre pSTAT3-Gehalt wurde anschließend im Western Blot analysiert. Für die Detektion von β Tubulin wurde die NC-Membran nach Ponceaufärbung geteilt. **(C)** DLD-1 Zellen wurden wie in Kapitel 2.3.5.1 beschrieben entweder mit STAT3-siRNA oder Kontroll-siRNA transfiziert. Zusätzlich wurden DLD-1 Zellen für Kontrollzwecke *mock*-transfiziert. Anschließend erfolgte die Stimulation für 30min und 2h mit IL-22 (20ng/ml) und IFN γ (10ng/ml) in Kombination. Der zelluläre pSTAT3-Gehalt wurde anschließend im Western Blot analysiert. Für die Detektion von Gesamt-STAT3 wurde die NC-Membran nachfolgend gestrippt. **(D)** DLD-1 Zellen wurden für 30min und 1h mit IL-22 (20ng/ml) bzw. IFN γ (10ng/ml) als Einzelstimulus oder in Kombination stimuliert. Der zelluläre pSTAT1-Gehalt wurde anschließend im Western Blot analysiert. Für die Detektion von β Tubulin wurde die NC-Membran nach Ponceaufärbung geteilt. **(A-D)** Unstimulierte DLD-1 Zellen wurden für alle Versuchsansätze als Kontrolle mitgeführt. Gezeigt ist jeweils ein repräsentativer Blot aus drei **(B-D)** bzw. vier **(A)** unabhängigen Versuchen.

3.1.2 IL-22 und IFN γ wirken synergistisch auf die iNOS-Expression in DLD-1 Kolonkarzinomzellen

In der Literatur ist beschrieben, dass in Kolorektalkarzinomen sowohl STAT3 als auch iNOS überproportional hoch exprimiert sind (siehe Kapitel 1.5.3.2 und 1.7). Aufgrund dessen sollte mit den nächsten Experimenten untersucht werden, inwiefern IL-22 die Expression der iNOS beeinflussen kann. Hierzu wurden DLD-1 Zellen für 4h und 20h mit IL-22 (20ng/ml) bzw. IFN γ (10ng/ml) als Einzelstimulus oder in Kombination stimuliert. Unstimulierte DLD-1 Zellen wurden als Kontrolle mitgeführt. Der Gehalt an iNOS- bzw. GAPDH-mRNA wurde nach Isolation der RNA mit der RNase-Verdauschutzanalyse

bestimmt. Zur Quantifizierung wurde die iNOS mRNA-Expression auf die GAPDH-mRNA normiert. Während IL-22 als Einzelstimulus nicht die Fähigkeit besaß, die iNOS-Expression zu induzieren, zeigte die Kostimulation mit IL-22 und IFN_γ sowohl nach 4h (Abbildung 3.3 A) als auch nach 20h (Abbildung 3.3 B) einen starken synergistischen Effekt auf die iNOS-Expression. Die suboptimale iNOS-Expression nach Stimulation mit IFN_γ als Einzelstimulus stimmt mit bereits publizierten Daten überein [134, 154].

A 4h



B 20h

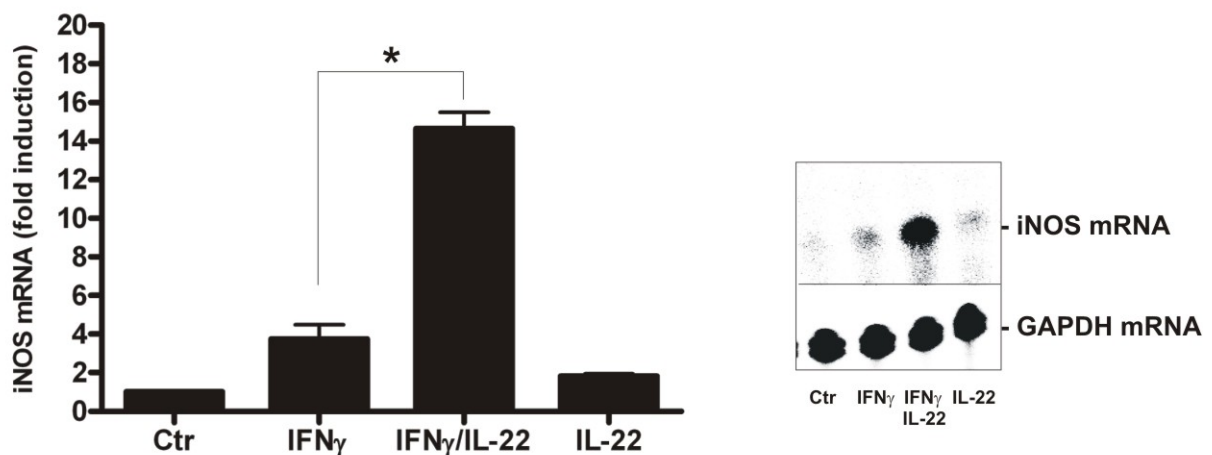


Abbildung 3.3 IL-22 und IFN_γ wirken synergistisch auf die iNOS mRNA-Expression in DLD-1 Kolonkarzinomzellen. DLD-1 Zellen wurden für 4h (A) und 20h (B) mit IL-22 (20ng/ml) bzw. IFN_γ (10ng/ml) als Einzelstimulus oder in Kombination stimuliert. Unstimulierte DLD-1 Zellen wurden als Kontrolle mitgeführt. Der Gehalt an iNOS- bzw. GAPDH-mRNA wurde nach Isolation der RNA mit der RNase-Verdauschutzanalyse quantifiziert und die iNOS-mRNA mittels GAPDH-mRNA normiert. Die Daten sind als x-fache Induktion im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle \pm Standardabweichung dargestellt (n=3; *p<0,05) (ungepaarter t-Test). Gezeigt ist jeweils ein repräsentativer RPA aus drei unabhängigen Versuchen.

Nachdem auf mRNA-Ebene ein synergistischer Effekt von IL-22 und IFN γ bezüglich der iNOS-Expression gezeigt werden konnte, sollte untersucht werden, ob sich dieser Befund auch nach der Translation der mRNA auf Proteinebene widerspiegelt. Um dies zu überprüfen, wurden DLD-1 Zellen für 24h mit IL-22 (20ng/ml) bzw. IFN γ (10ng/ml) als Einzelstimulus oder in Kombination stimuliert. Unstimulierte DLD-1 Zellen wurden als Kontrolle mitgeführt. Der zelluläre iNOS-Gehalt wurde nach Zellyse im Western Blot analysiert. Das Ergebnis war auch hier eine markante iNOS-Expression nach Kostimulation mit IL-22 und IFN γ , wobei weder IL-22 noch IFN γ als Einzelstimulus die iNOS-Expression induzieren konnten (Abbildung 3.4 A). Interessanterweise war die Proteinexpression auch 40h nach Kostimulation mit IL-22 und IFN γ noch zu sehen, was auf eine persistierende Aktivierung der iNOS-Expression unter diesen Bedingungen hinweist (Abbildung 3.4 B).

Um zu kontrollieren, ob das exprimierte Protein aktiv ist, wurde in den Zellkulturüberständen Nitrit als ein stabiles Endprodukt des NO-Metabolismus gemessen. Dazu wurden DLD-1 Zellen für 48h mit den angegebenen Konzentrationen an IL-22 bzw. IFN γ (10ng/ml) als Einzelstimulus oder mit einer entsprechenden Kombination stimuliert. Auch hier wurden unstimulierte DLD-1 Zellen als Kontrolle mitgeführt. In Übereinstimmung mit den Proteindaten zeigte sich nach Kostimulation durch IL-22 und IFN γ ein erhöhter Nitritspiegel im Vergleich zu den beiden Einzelstimuli (Abbildung 3.4 C). Dies lässt auf eine gesteigerte iNOS-Aktivität schließen. Die beobachtete 2-3-fache Steigerung der Nitritkonzentration bestätigt frühere Arbeiten hinsichtlich der Quantität Zytokin-induzierter iNOS-Aktivität in humanen epithelialen Zellen [158]. Um abzuklären, ob der beobachtete Synergieeffekt bezüglich der iNOS-Expression spezifisch für DLD-1 Zellen ist oder auch in anderen epithelialen Kolonkarzinomzellen auftritt, wurden postkonfluente Caco-2 Zellen für 24h mit IL-22 (20ng/ml) bzw. IFN γ (10ng/ml) als Einzelstimulus oder in Kombination inkubiert. Unstimulierte Caco-2 Zellen wurden als Kontrolle mitgeführt. In Übereinstimmung mit den Beobachtungen in DLD-1 Zellen stellte sich heraus, dass der Synergismus von IL-22 und IFN γ in Bezug auf die iNOS-Expression auch in Caco-2 Zellen existiert (Abbildung 3.4 D). Zwischen dem proinflammatorischen Zytokine IL-6 und IL-22 besteht eine enge Verwandtschaft hinsichtlich der von ihnen ausgelösten Signaltransduktion. Wie IL-22 ist auch IL-6 ein effizienter Aktivator des Transkriptionsfaktors STAT3 [239]. Somit bestand die Möglichkeit, dass IL-6 ebenso die iNOS-Expression nach Stimulation mit IFN γ verstärkt. Zur Abklärung dieser Möglichkeit wurden DLD-1 Zellen mit IL-6 (20ng/ml) bzw. IFN γ (10ng/ml) als Einzelstimulus oder in Kombination für 24h inkubiert. Zusätzlich wurden DLD-1 Zellen mit einer Kombination aus IL-22 (20ng/ml) und IFN γ (10ng/ml) behandelt. Unstimulierte DLD-1

Zellen wurden als Kontrolle mitgeführt. Es zeigte sich, dass IL-6 in Kombination mit IFN γ ähnlich wie IL-22 und IFN γ synergistisch auf die iNOS-Expression wirkt (Abbildung 3.4 E). Als Einzelstimulus konnte IL-6 in Übereinstimmung mit IL-22 keine iNOS-Expression induzieren.

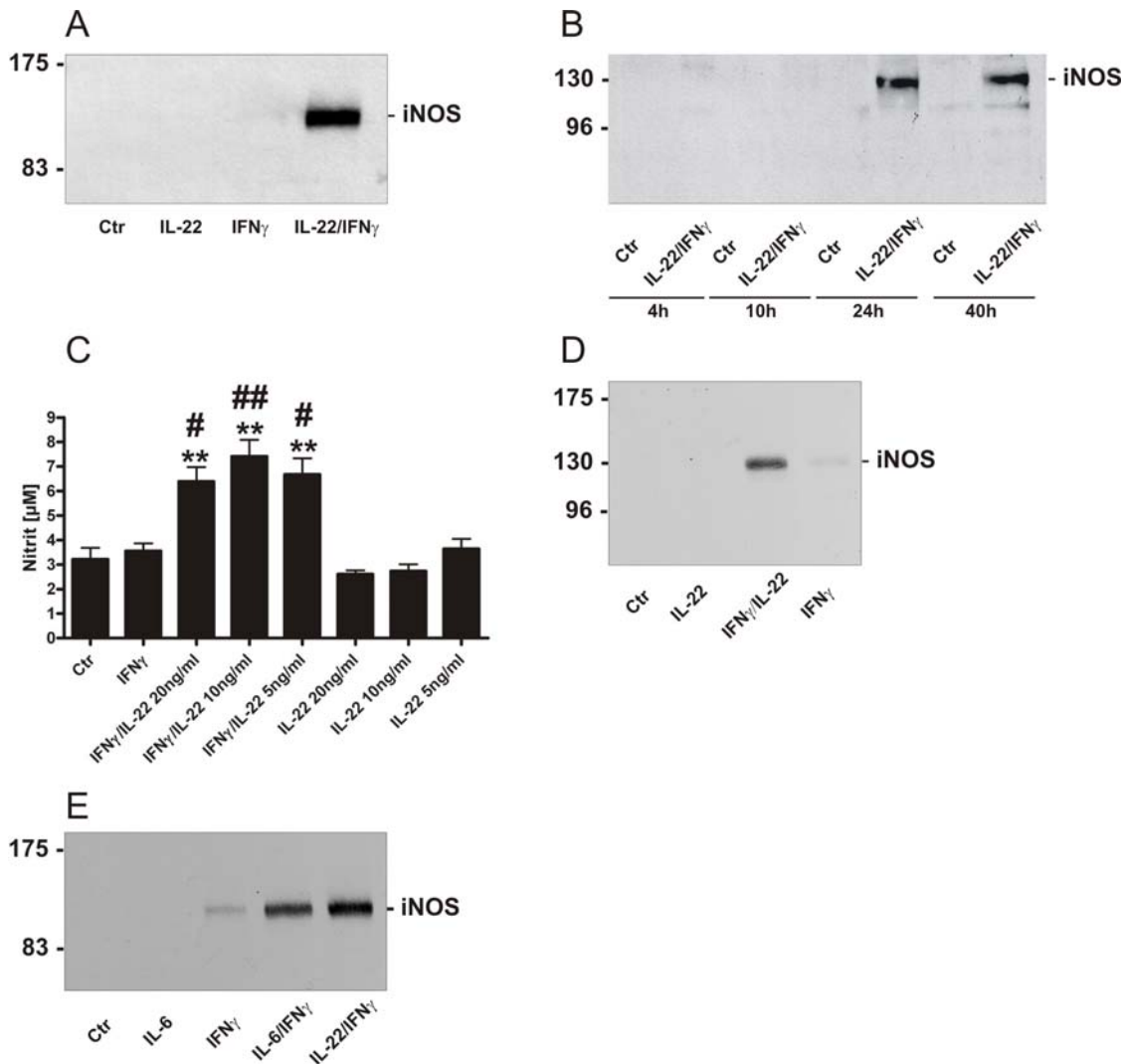


Abbildung 3.4 IL-22 und IFN γ wirken synergistisch auf die iNOS-Proteinexpression in DLD-1 Kolonkarzinomzellen. (A) DLD-1 Zellen wurden für 24h mit IL-22 (20ng/ml) bzw. IFN γ (10ng/ml) als Einzelstimulus oder in Kombination stimuliert. (B) DLD-1 Zellen wurden für 4h, 10h, 24h und 40h mit IL-22 (20ng/ml) und IFN γ (10ng/ml) in Kombination stimuliert. (C) DLD-1 Zellen wurden für 48h mit den angegebenen Konzentrationen an IL-22 bzw. IFN γ (10ng/ml) als Einzelstimulus oder mit einer entsprechenden Kombination stimuliert. Anschließend wurde in den Zellkulturüberständen der Nitritgehalt mittels Griess-Assay bestimmt. Die Daten sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt (n=3; **p<0,01 verglichen mit unstimulierter Kontrolle; #p<0,05 verglichen mit IFN γ allein; ###p<0,01 verglichen mit IFN γ allein) (ungepaarter t-Test). (D) Postkonfluente Caco-2 Zellen wurden für 24h mit IL-22 (20ng/ml) und IFN γ (10ng/ml) als Einzelstimulus oder in Kombination inkubiert. (E) DLD-1 Zellen wurden mit IL-6 (20ng/ml) bzw. IFN γ (10ng/ml) als Einzelstimulus oder in Kombination für 24h inkubiert. Zusätzlich wurden DLD-1 Zellen mit einer Kombination aus IL-22 (20ng/ml) und IFN γ (10ng/ml) behandelt. (A-E) Unstimulierte DLD-1 Zellen wurden in allen Ansätzen als Kontrolle mitgeführt. (A, B, D, E) Der zelluläre iNOS-Gehalt wurde nach Zellyse im Western Blot analysiert. Gezeigt ist jeweils ein repräsentativer Blot aus drei (B, D & E) bzw. fünf (A) unabhängigen Experimenten.

3.1.3 Hemmung der STAT3-Expression durch siRNA-Technologie reduziert die IL-22/IFN γ -induzierte iNOS-Expression in DLD-1 Zellen

Um die Rolle von STAT3 bei der IL-22/IFN γ -induzierten iNOS-Expression zu untersuchen, wurde die Expression des Transkriptionsfaktors unter Verwendung einer spezifischen STAT3-siRNA gehemmt. Für dieses Set an Experimenten wurden DLD-1 Zellen, wie in Kapitel 2.3.5.1 beschrieben, mit jeweils 50nM einer STAT3-siRNA bzw. einer Kontroll-siRNA für 72h transfiziert und anschließend mit einer Kombination aus IL-22 (20ng/ml) und IFN γ (10ng/ml) inkubiert. Zusätzlich wurden DLD-1 Zellen ohne Zugabe von siRNA (*mock*-Kontrolle) als unstimulierte bzw. stimulierte (20ng/ml IL-22 und 10ng/ml IFN γ) Kontrolle mitgeführt. Nach einer Stimulation von 24h wurden die Zellen lysiert und der zelluläre Gehalt an iNOS, STAT3 und β Tubulin im Western Blot analysiert. In allen Versuchen war die Hemmung der STAT3-Expression mit einer markanten Reduktion der iNOS-Expression assoziiert. In Abbildung 3.5 A ist der Western Blot eines repräsentativen Versuches dargestellt. Dieser zeigt sehr deutlich, dass STAT3 eine zentrale Rolle in der IL-22/IFN γ -vermittelten Induktion der iNOS-Expression spielt. Eine densitometrische Quantifizierung dieses Experiments ist in Abbildung 3.5 B dargestellt. Die lineare Regression in Abbildung 3.5 C verdeutlicht die enge Korrelation zwischen gehemmter STAT3-Expression und reduzierter iNOS-Expression in allen vier Experimenten ($r=0,9921$). Dieses Diagramm zeigt auch, dass die insuffiziente Hemmung der STAT3-Expression in einem der vier Experimente (41,5% verglichen mit der *mock*-Kontrolle IL-22/IFN γ -stimulierter DLD-1 Zellen) nur eine minimale Reduktion der iNOS-Expression zur Folge hat (75,6% verglichen mit der *mock*-Kontrolle IL-22/IFN γ -stimulierter DLD-1 Zellen).

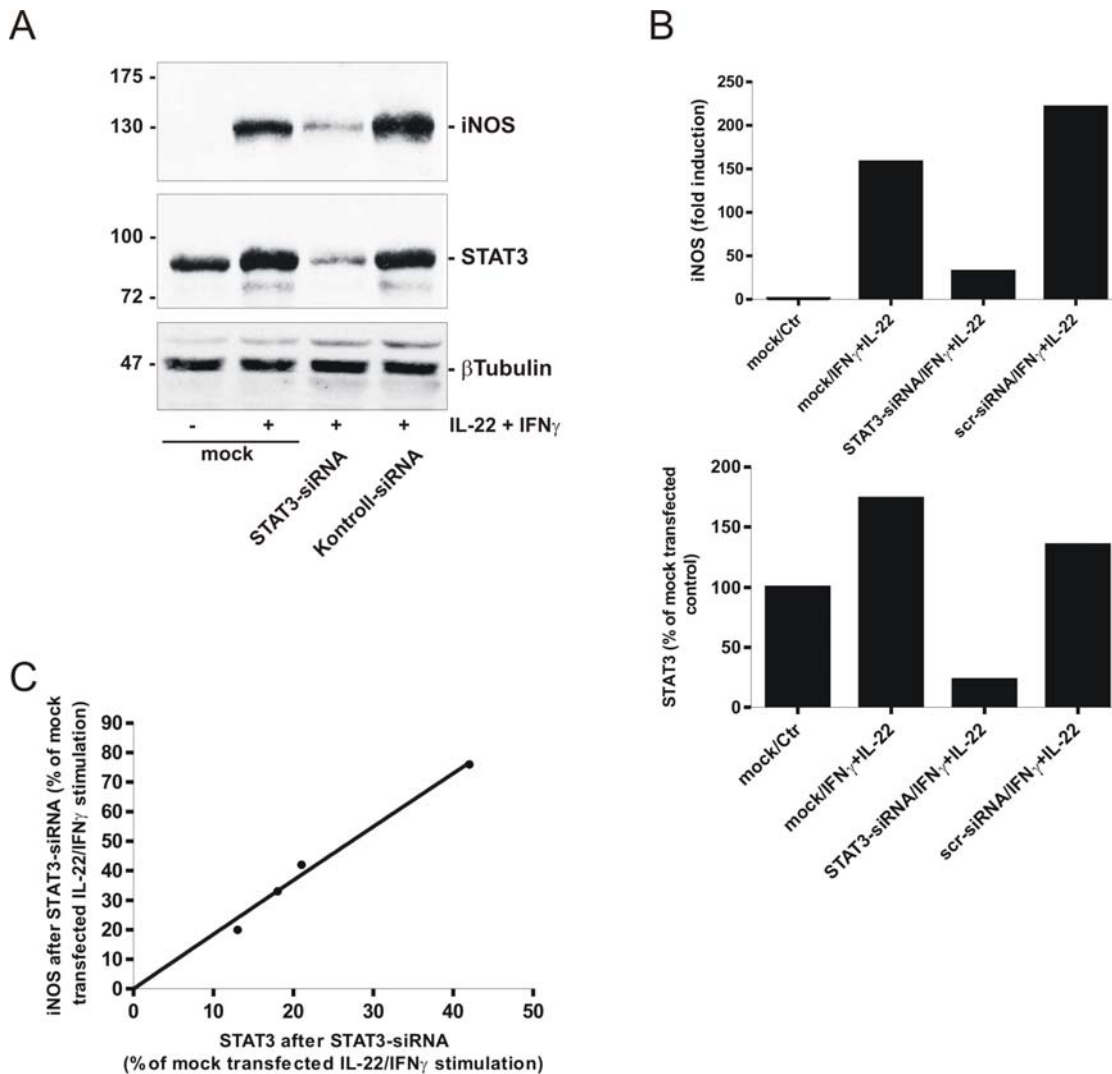


Abbildung 3.5 Hemmung der STAT3-Expression durch siRNA-Technologie vermindert die Induktion von iNOS durch IL-22/IFN γ . (A) DLD-1 Zellen wurden, wie in Kapitel 2.3.5.1 beschrieben, mit jeweils 50nM einer STAT3-siRNA bzw. einer Kontroll-siRNA für 72h transfiziert und anschließend mit einer Kombination aus IL-22 (20ng/ml) und IFN γ (10ng/ml) für weitere 24h inkubiert. Zusätzlich wurden DLD-1 Zellen ohne Zugabe von siRNA (*mock*-Kontrolle) als unstimulierte bzw. stimulierte (20ng/ml IL-22 und 10ng/ml IFN γ) Kontrolle mitgeführt. Der zelluläre Proteingehalt an iNOS, STAT3 und β Tubulin wurde im Western Blot analysiert. Hierfür wurde die NC-Membran nach Ponceaufärbung in drei Teile geschnitten. Die Abbildung zeigt einen repräsentativen Blot aus vier unabhängigen Versuchen. (B) Densitometrische Quantifizierung der iNOS- und STAT3-Expression (bezogen auf β Tubulin) des in 3.5 A gezeigten Experiments. (C) Lineare Regression der quantifizierten Daten der iNOS- und STAT3-Expression aus allen vier Experimenten ($r=0,9921$).

3.1.4 IL-22 verstärkt die Aktivierung des humanen iNOS-Promotors

Die siRNA-Experimente zeigten, dass der Effekt von IL-22 hinsichtlich der iNOS-Expression durch STAT3 vermittelt wird. Daher ist es naheliegend, dass der IL-22-vermittelten iNOS-Induktion ein transkriptioneller Regulationsmechanismus zu Grunde liegt. Das nächste Experiment sollte daher klären, in welchem Ausmaß die Aktivierung des humanen iNOS-Promotors auf IL-22 zurückzuführen ist. Hierfür wurden DLD-1 Zellen verwendet, die

durch eine stabile Transfektion die *Photinus pyralis* (Firefly)-Luciferase überexprimieren, welche unter der Kontrolle eines 16kb-iNOS-Promotorkonstrukts steht (DLD-1/pXP₂-16kb). Diese Zellen wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Hartmut Kleinert (Johannes-Gutenberg-Universität Mainz) zur Verfügung gestellt. Für diese Versuche wurden DLD-1/pXP₂-16kb Zellen für 6h mit IL-22 (20ng/ml) und IFN γ (10ng/ml) als Einzelstimulus oder in Kombination inkubiert. Unstimulierte DLD-1/pXP₂-16kb Zellen wurden als Kontrolle mitgeführt. Die Zellen wurden anschließend, wie in Kapitel 2.5.7 beschrieben, geerntet und die Luciferase-Aktivität wurde auf den Gesamtproteingehalt normiert. Die unstimulierten DLD-1/pXP₂-16kb Zellen wurden dabei als 100% dargestellt. Im Vergleich dazu konnte gezeigt werden, dass nach Stimulation mit IL-22 bzw. IFN γ die basale Promotoraktivität tendenziell erhöht ist (Abbildung 3.6). Eine signifikante Erhöhung der iNOS-Promotoraktivität war jedoch nur mit der Kombination aus IL-22 und IFN γ erreichbar.

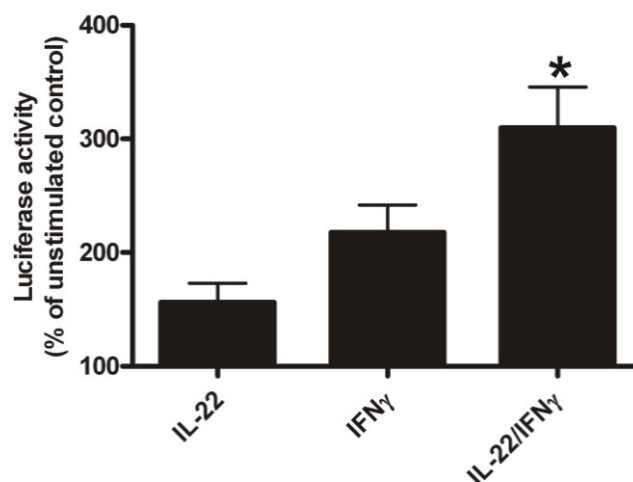


Abbildung 3.6 IL-22 verstärkt die basale iNOS-Promotoraktivität. DLD-1/pXP₂-16kb Zellen wurden für 6h mit IL-22 (20ng/ml) und IFN γ (10ng/ml) als Einzelstimulus oder in Kombination inkubiert. Unstimulierte DLD-1/pXP₂-16kb Zellen wurden als Kontrolle mitgeführt. Die Zellen wurden lysiert und die Luciferase-Aktivität wurde auf den Gesamtproteingehalt normiert. Unstimulierte DLD-1/pXP₂-16kb Zellen wurden dabei als 100% dargestellt. Die Daten wurden als % der unstimulierten Kontrolle \pm Standardabweichung gezeigt (n=6; alle Versuche wurden in Triplikaten durchgeführt; *p<0,05 verglichen mit unstimulierter Kontrolle (ungepaarter t-Test)).

3.1.5 IRF-1, NF κ B und GAS-Elemente haben in der IL-22-vermittelten iNOS-Induktion keine Relevanz

Da die vorherigen Experimente einen Hinweis auf mögliche transkriptionelle Regulationsmechanismen gaben, sollte im Folgenden die Rolle der Transkriptionsfaktoren IRF-1 und NF κ B untersucht werden, die bekanntermaßen an der Regulation der iNOS-Expression beteiligt sind. Darüber hinaus sollte der Einfluss von IL-22 auf die GAS-Elemente untersucht werden, welche ebenfalls einen zentralen Parameter in der IFN γ /STAT1-induzierten iNOS-Expression darstellen (siehe Kapitel 1.5.2).

Interferon regulatory factor 1 (IRF-1) gehört zu einer Familie von Transkriptionsfaktoren, die durch den STAT1-Signalweg aktiviert werden. IRF-1 reguliert die Transkription wichtiger IFN-induzierbarer Gene. Dies wirft die Frage auf, ob IRF-1 auch nach Stimulation mit IL-22 via STAT3 aktiviert werden kann. Um dies zu klären, wurden DLD-1 Zellen mit IL-22 (20ng/ml) und IFN γ (10ng/ml) als Einzelstimulus oder in Kombination für 1h stimuliert. Unstimulierte DLD-1 Zellen wurden als Kontrolle mitgeführt. Anschließend wurden die Kernproteine isoliert (siehe Kapitel 2.5.1.2) und der nukleäre Gehalt an IRF-1 im Western Blot analysiert. Der Western Blot in Abbildung 3.7 A bestätigt die bereits bekannte Induktion von IRF-1 durch IFN γ . Auch IL-22 vermag IRF-1 minimal zu aktivieren, wobei die Kombination beider Zytokine keine weitere Verstärkung der IFN γ -induzierten IRF-1-Aktivierung zur Folge hatte. Dieses Ergebnis zeigt, dass eine IRF-1-Aktivierung als möglicher Mechanismus in der IL-22-vermittelten iNOS-Expression keine wesentliche Rolle zu spielen scheint.

Bei der Regulation der humanen iNOS in DLD-1 Zellen ist NF κ B ein weiterer wichtiger Transkriptionsfaktor (siehe Kapitel 1.5.2). Doch auch hier ist unklar, inwiefern NF κ B in der IL-22-vermittelten iNOS-Expression relevant ist. Um dies zu klären, wurden DLD-1 Zellen mit IL-22 (20ng/ml) und IFN γ (10ng/ml) als Einzelstimulus oder in Kombination stimuliert. Als Positivkontrolle wurden DLD-1 Zellen mit einer Kombination aus TNF α (50ng/ml) und IL-1 β (50ng/ml) inkubiert. Unstimulierte DLD-1 Zellen wurden als Kontrolle mitgeführt. Nach 2h wurden die Kernproteine isoliert und die NF κ B-Aktivierung wurde mittels EMSA analysiert (siehe Kapitel 2.5.6). Zur Charakterisierung der retardierten Protein-DNA-Komplexe wurde ein p65-Antikörper verwendet. Das Protein p65 ist eine Untereinheit von NF κ B und durch Zugabe des Antikörpers sollte der bandshift spezifiziert werden. Der EMSA zeigt, dass IL-22 die basale konstitutive NF κ B-Aktivierung in DLD-1 Zellen nicht

verstärken konnte (Abbildung 3.7 B). Der Protein-DNA-Komplex, der unter basalen Bedingungen (Spur 2-5) und induzierbar durch $\text{TNF}\alpha$ und $\text{IL-1}\beta$ (Spur 7) deutlich zu erkennen ist, verschwindet in der Anwesenheit des p65-Antikörpers (Spur 6 und 8), was auf eine Beteiligung von p65 in diesem Komplex hinweist. Dieses Experiment zeigt, dass die $\text{IL-22/IFN}\gamma$ -vermittelte Induktion der iNOS-Expression nicht mit einer erhöhten $\text{NF}\kappa\text{B}$ -Aktivierung verbunden ist und somit $\text{NF}\kappa\text{B}$ nicht an der Verstärkung der iNOS-Expression unter dem Einfluss von IL-22 beteiligt ist.

Bei der Regulation vieler $\text{IFN}\gamma$ -induzierter Gene erfüllen GAS-Elemente (*γ activated sites*) im Promotorbereich eine zentrale Funktion. Hier binden STAT-Dimere nach ihrer Aktivierung und steuern so die Transkription dieser Gene. Daher war es interessant zu wissen, ob GAS-Elemente an der Verstärkung der iNOS-Expression unter dem Einfluss von IL-22 beteiligt sind. Hierfür wurden DLD-1 Zellen, wie in Kapitel 2.3.5.2 beschrieben, mit pGAS-Luc bzw. pCIS-CK und pRL-TK kotransfiziert. pGAS-Luc ist ein induzierbares Reporterplasmid, in welchem die Expression des (*Firefly*) Luciferase-Reportergens über ein basales Promotorelement (TATA-Box) und ein *cis*-GAS-Element kontrolliert wird. Als negatives Kontrollplasmid mit fehlendem *cis*-Element dient pCIS-CK und zum internen Abgleich wurde pRL-TK verwendet, welches für die *Renilla*-Luciferase kodiert. 24h nach Transfektion wurden die DLD-1 Zellen mit IL-22 (20ng/ml) und $\text{IFN}\gamma$ (3ng/ml) als Einzelstimulus oder in Kombination für 24h stimuliert. Unstimulierte DLD-1 Zellen wurden als Kontrolle mitgeführt. Anschließend wurden die Zellen wie in Kapitel 2.5.7 beschrieben lysiert und die (*Firefly*) Luciferase-Aktivität wurde auf die (*Renilla*) Luciferase-Aktivität normiert. Das Ergebnis zeigt, dass IL-22 die deutlich erhöhte Luciferase-Aktivität nach Stimulation mit $\text{IFN}\gamma$ nicht weiter verstärken kann (Abbildung 3.7 C). Ähnliche Befunde wurden auch mit höheren Konzentrationen an $\text{IFN}\gamma$ (10ng/ml) erzielt (Daten nicht gezeigt). Auch diese Versuche zeigen, dass IL-22 keinen Einfluss auf aktivierende GAS-Elemente hinsichtlich einer erhöhten iNOS-Expression aufweist.

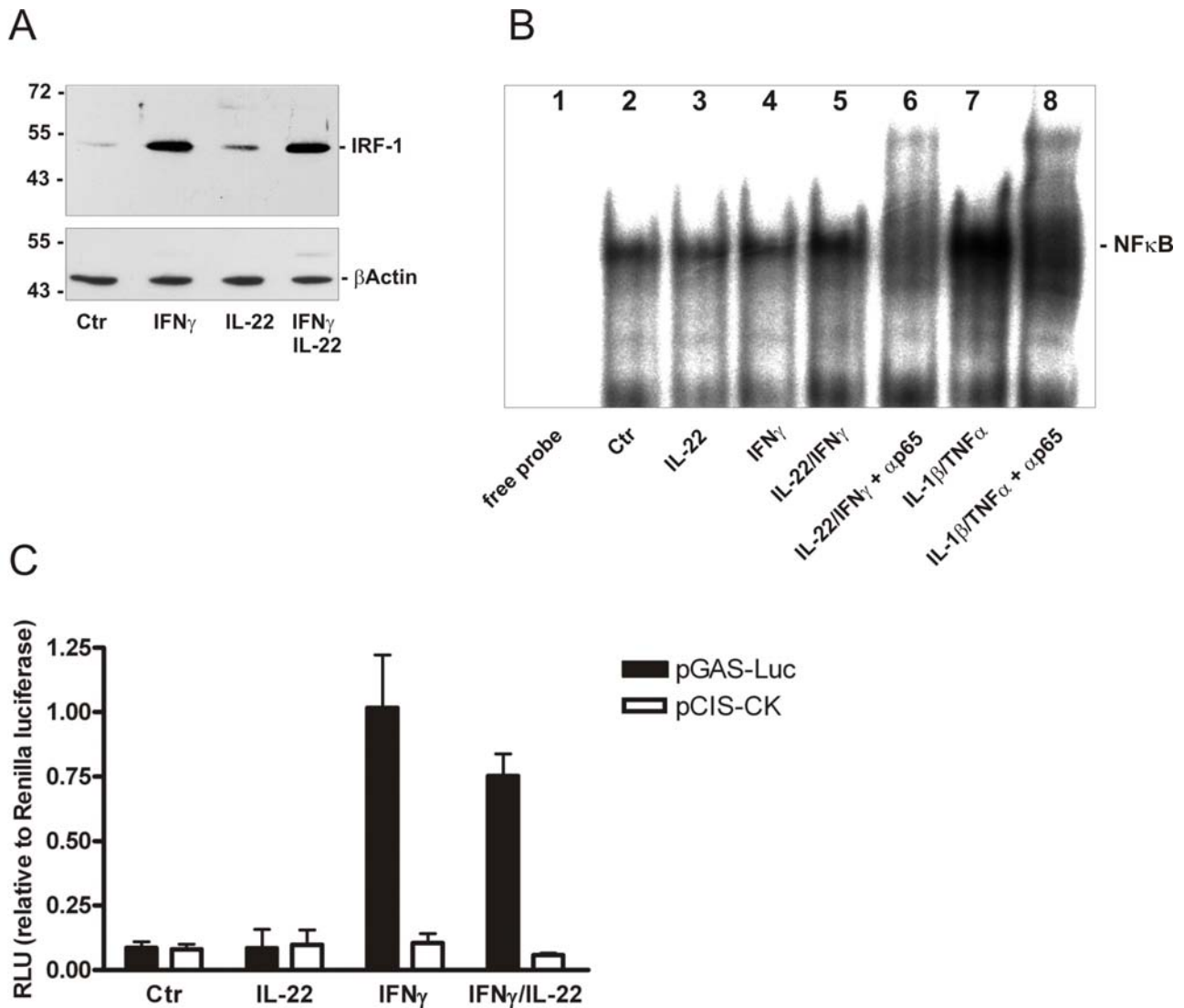


Abbildung 3.7 IRF-1, NF κ B und GAS-Elemente haben bezüglich der IL-22-vermittelten iNOS-Induktion keine Relevanz. (A) DLD-1 Zellen wurden mit IL-22 (20ng/ml) und IFN γ (10ng/ml) als Einzelstimulus oder in Kombination für 1h stimuliert. Anschließend wurden die Kernproteine isoliert und der nukleäre Gehalt an IRF-1 im Western Blot analysiert. Dargestellt ist ein repräsentativer Blot aus drei unabhängigen Versuchen. (B) DLD-1 Zellen wurden mit IL-22 (20ng/ml) und IFN γ (10ng/ml) als Einzelstimulus oder in Kombination stimuliert. Als Positivkontrolle wurden DLD-1 Zellen mit TNF α (50ng/ml) und IL-1 β (50ng/ml) inkubiert. Nach 2h wurden die Kernproteine isoliert und die NF κ B-Aktivierung mittels EMSA analysiert. Zur Charakterisierung der retardierten Protein-DNA-Komplexe wurde in die angegebenen Proben ein p65-Antikörper gegeben. Dargestellt ist ein repräsentativer EMSA aus drei unabhängigen Versuchen. (C) DLD-1 Zellen wurden mit pGAS-Luc bzw. pCIS-CK und pRL-TK kotransfiziert. 24h nach Transfektion wurden die DLD-1 Zellen mit IL-22 (20ng/ml) und IFN γ (3ng/ml) als Einzelstimulus oder in Kombination für 24h stimuliert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die (*Firefly*) Luciferase-Aktivität wurde bezogen auf die (*Renilla*) Luciferase-Aktivität normiert. Das Diagramm zeigt einen Versuch, welcher in Triplikaten durchgeführt wurde. (Darstellung der Mittelwerte der Triplikate \pm Standardabweichung als RLU (relative light unit) *Firefly*-Luciferase bezogen auf *Renilla*-Luciferase). (A-C) Für alle Ansätze wurden unstimulierte DLD-1 Zellen als Kontrolle mitgeführt.

3.1.6 IL-22 hat keinen Einfluss auf die iNOS mRNA-Stabilität

Eine weitere Möglichkeit der Einflussnahme von IL-22 auf die iNOS-Expression ist die Regulation der iNOS mRNA-Stabilität durch Veränderung der Halbwertszeit. Zur Bestimmung der iNOS mRNA-Stabilität unter dem Einfluss von IL-22 wurden DLD-1 Zellen mit einem Zytokin-Mix (10ng/ml $\text{IFN}\gamma$, 50ng/ml $\text{TNF}\alpha$ und 50ng/ml $\text{IL-1}\beta$) inkubiert. Nach 10h wurde IL-22 (20ng/ml) entweder 4h vor Inkubation mit Aktinomycin D (10 $\mu\text{g/ml}$) (Abbildung 3.8 A) oder simultan mit Aktinomycin D (Abbildung 3.8 B) zu den Zellen gegeben. Unmittelbar vor Zugabe von Aktinomycin D (0h) und nach jeweils 2h, 4h, 6h und 8h in Anwesenheit von Aktinomycin D wurde die RNA isoliert und die iNOS mRNA-Expression wurde relativ zur GAPDH mRNA-Expression mittels RNase-Verdauerschutzanalyse bestimmt.

Die Verwendung des Zytokin-Mixes war notwendig, da $\text{IFN}\gamma$ als Einzelstimulus nicht das Potential hat, die iNOS-Expression so stark zu induzieren, um für die anschließende Inkubation mit Aktinomycin D eine ausreichende Basis zu schaffen. Aktinomycin D ist ein Inhibitor der Transkription und daher ein wichtiges Hilfsmittel zur Bestimmung der mRNA-Halbwertszeit von Zielgenen wie beispielsweise der iNOS.

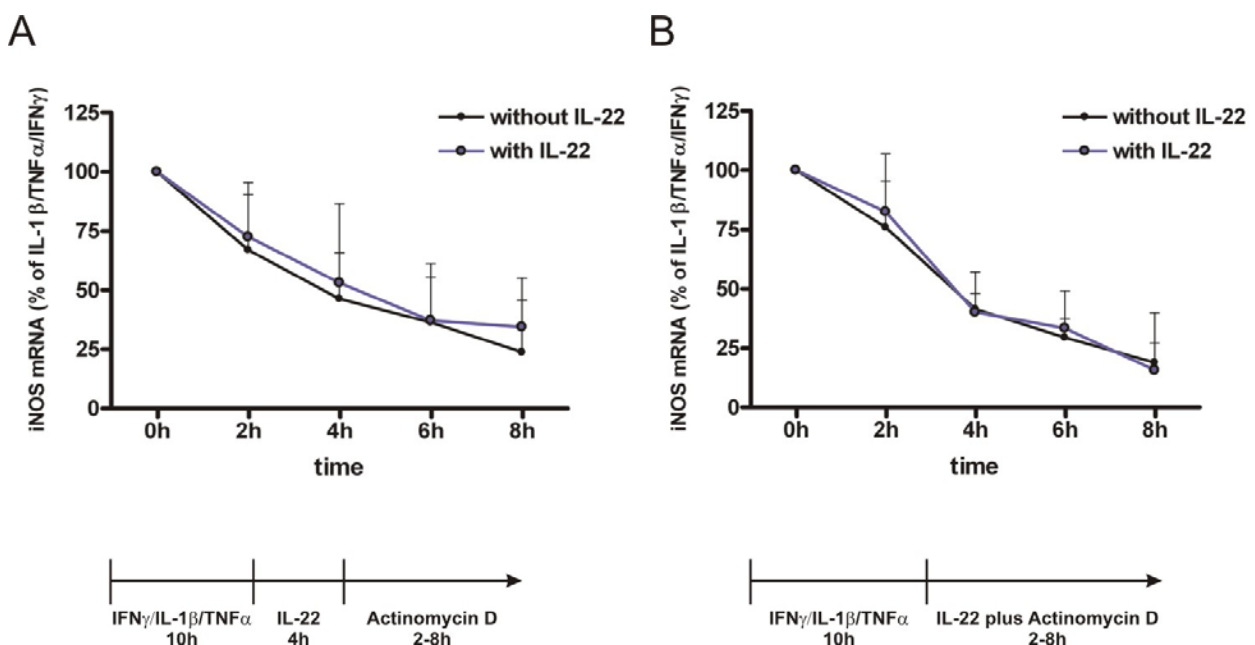


Abbildung 3.8 IL-22 hat keinen Einfluss auf die iNOS mRNA-Stabilität. Zur Bestimmung der iNOS mRNA-Stabilität wurde die iNOS-mRNA in DLD-1 Zellen durch Inkubation mit einem Zytokin-Mix (10ng/ml $\text{IFN}\gamma$, 50ng/ml $\text{TNF}\alpha$ und 50ng/ml $\text{IL-1}\beta$) induziert. Nach 10h wurde IL-22 (20ng/ml) 4h vor Inkubation mit Aktinomycin D (10 $\mu\text{g/ml}$) (n=5) (**A**) oder simultan mit Aktinomycin D (n=4) (**B**) zu den Zellen gegeben. Unmittelbar vor Zugabe von Aktinomycin D (0h) und nach jeweils 2h, 4h, 6h und 8h in Anwesenheit von Aktinomycin D wurde die RNA isoliert und die iNOS-mRNA relativ zur GAPDH-mRNA mittels RNase-Verdauerschutzanalyse bestimmt. Die iNOS mRNA-Expression ist als % von $\text{IL-1}\beta/\text{TNF}\alpha/\text{IFN}\gamma \pm$ Standardabweichung zum Zeitpunkt 0h (Zugabe von Aktinomycin D) dargestellt.

Eine Inkubation mit IL-22 für 4h im ersten Ansatz sollte die Möglichkeit schaffen, potentielle indirekte Effekte von IL-22 hinsichtlich der Stabilisierung der iNOS-mRNA zu vermitteln (siehe Abbildung 3.3 A). Mit dem zweiten Protokoll sollte die Transkription sofort gehemmt werden, um direkte Einflüsse von IL-22 auf die iNOS mRNA-Stabilität zu untersuchen. Mit beiden Protokollen wurde eine iNOS-Halbwertszeit von etwa 4h bestimmt. Dieser Wert stimmt sehr gut mit der in der Literatur zu findenden Halbwertszeit der humanen iNOS-mRNA überein [254]. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine Modulation der iNOS mRNA-Stabilität durch IL-22 nicht beobachtet werden konnte.

3.1.7 IL-22 ist kein genereller Verstärker von IFN γ -Antworten

Ein interessanter Aspekt wäre die Vorstellung, dass IL-22 generell die Induktion IFN γ -abhängiger Gene potenziert. Zu dieser Gruppe gehören neben antiinflammatorischen Proteinen wie IL-18BP α [255] auch proinflammatorische Proteine wie IP-10/CXCL-10 [256]. Um zu untersuchen, ob IL-22 die Fähigkeit besitzt, die IFN γ -vermittelte IL-18BP α -Expression in DLD-1 Zellen zu verstärken, wurden DLD-1 Zellen mit IL-22 (20ng/ml) und IFN γ (10ng/ml) als Einzelstimulus oder in Kombination stimuliert. Da IL-18BP α in das Zellkulturmedium sezerniert wird, wurde das Protein im Zellkulturüberstand nach 24h mit Trichloressigsäure präzipitiert (siehe Kapitel 2.5.1.3). Unstimulierte DLD-1 Zellen wurden als Kontrolle mitgeführt. Anschließend wurde der Gehalt an IL-18BP α in den Präzipitaten mittels Western Blot analysiert. In Abbildung 3.9 A ist die Tendenz einer leicht erhöhten Sekretion von IL-18BP α nach Kostimulation mit IL-22 und IFN γ im Vergleich zu IFN γ als Einzelstimulus zu vermuten. Dabei ist die Glykosylierung des Proteins der Grund für das Fehlen einer distinkten Bande. Da der Western Blot in diesem Fall nicht ausreichend genaue Ergebnisse lieferte und da IL-18BP α primär auf mRNA-Ebene reguliert ist, wurde im Folgenden der Einfluss von IL-22 auf die IL-18BP α mRNA-Expression nach Stimulation mit IFN γ untersucht. Dafür wurden DLD-1 Zellen mit den jeweils angegebenen Konzentrationen an IFN γ als Einzelstimulus oder in Anwesenheit von IL-22 (20ng/ml) für 20h stimuliert. Unstimulierte DLD-1 Zellen wurden als Kontrolle mitgeführt. Anschließend wurde die IL-18BP α mRNA-Expression mittels quantitativer *real time*-PCR bestimmt. Hierbei wurde deutlich, dass der Einfluss von IL-22 auf die IFN γ -vermittelte IL-18BP α -Expression eher moderat ausfiel und daher vernachlässigbar war (Abbildung 3.9 B).

Ein weiteres IFN γ -induzierbares Gen ist IP-10/CXCL-10 (*interferon-inducible protein-10*). Um zu kontrollieren, ob IL-22 die IP-10/CXCL-10-Sekretion in IFN γ -aktivierten DLD-1 Zellen potenzieren kann, wurden DLD-1 Zellen mit den jeweils angegebenen Konzentrationen an IFN γ als Einzelstimulus oder in Anwesenheit von IL-22 (20ng/ml) für 20h stimuliert. Unstimulierte DLD-1 Zellen wurden als Kontrolle mitgeführt. Anschließend wurden die Konzentrationen an sezerniertem IP-10/CXCL-10 in den Zellkulturüberständen mittels ELISA quantifiziert. Mit diesem Experiment wurde deutlich, dass IL-22 die IFN γ -induzierte IP-10/CXCL-10-Sekretion nicht verstärken kann (Abbildung 3.9 C). Somit ist IL-22 kein genereller Amplifikator der IFN γ -induzierten Genexpression.

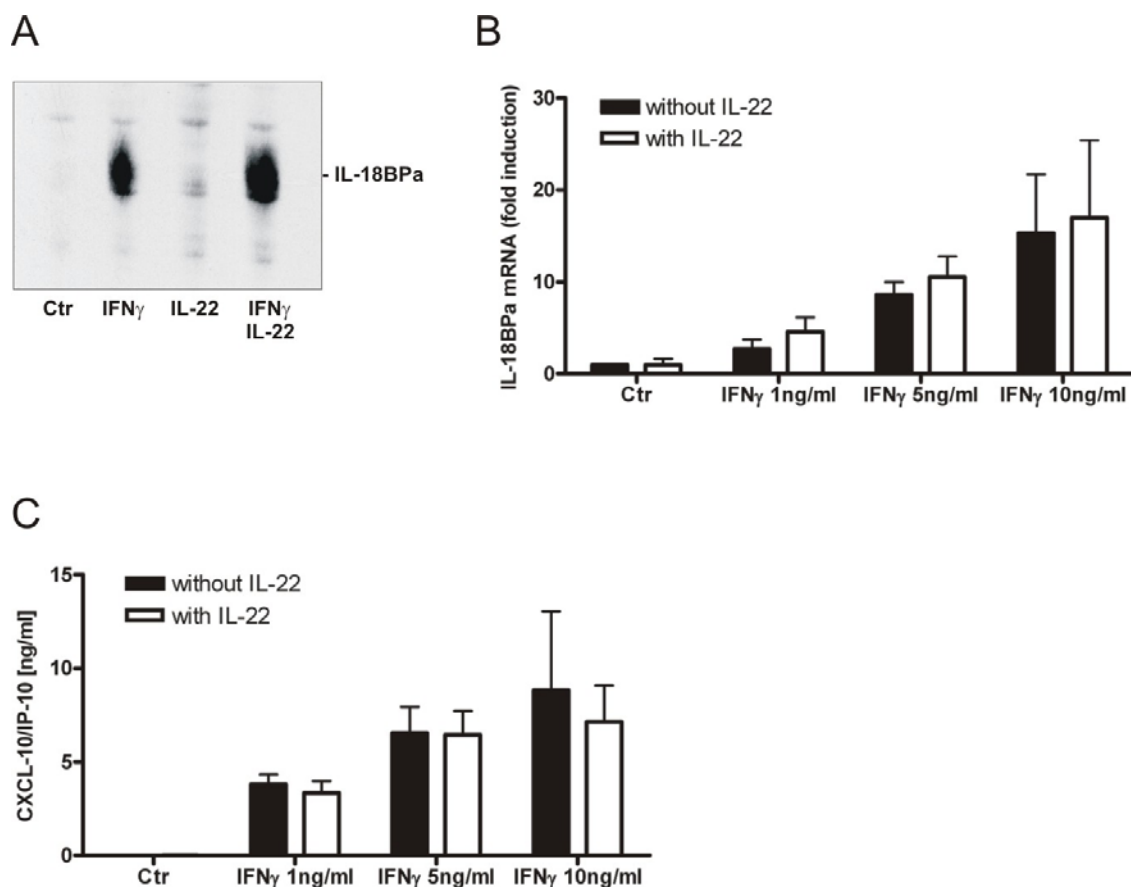


Abbildung 3.9 IL-22 ist kein genereller Verstärker von IFN γ -Antworten. (A) DLD-1 Zellen wurden mit IL-22 (20ng/ml) und IFN γ (10ng/ml) als Einzelstimulus oder in Kombination stimuliert. Nach 24h wurde das sezernierte IL-18BPα im Zellkulturüberstand mit Trichloressigsäure präzipitiert. Anschließend wurde der Gehalt an IL-18BPα im Western Blot analysiert. (B) DLD-1 Zellen wurden mit den jeweils angegebenen Konzentrationen an IFN γ als Einzelstimulus oder in Anwesenheit von IL-22 (20ng/ml) für 20h stimuliert. Anschließend wurde die IL-18BPα mRNA-Expression mittels quantitativer *real time*-PCR bestimmt und auf die GAPDH-mRNA normiert. (n=3; Darstellung als x-fache Induktion verglichen mit unstimulierter Kontrolle \pm Standardabweichung) (C) DLD-1 Zellen wurden mit den jeweils angegebenen Konzentrationen an IFN γ als Einzelstimulus oder in Anwesenheit von IL-22 (20ng/ml) für 20h stimuliert. Anschließend wurden die Konzentrationen an IP-10/CXCL-10 in den Zellkulturüberständen mittels ELISA bestimmt (n=5; Darstellung als Mittelwert \pm Standardabweichung). (A-C) In allen Ansätzen wurden unstimulierte DLD-1 Zellen als Kontrolle mitgeführt.

3.2 IL-22-Sekretion in der Sepsis

Sepsis ist die Haupttodesursache bei intensivmedizinisch betreuten Patienten in den Vereinigten Staaten. Jährlich erkranken dort 750.000 Menschen an einer Sepsis, deren Verlauf für 210.000 Patienten tödlich ist [257, 258]. Die Literatur der letzten Jahre zeigt, dass die exzessive Produktion von NO nach verstärkter Aktivierung der iNOS durch LPS, LTA und proinflammatorische Zytokine als eine wichtige Ursache für die Entwicklung der charakteristischen Symptome des septischen Schocks einzustufen ist. Die bisherigen Ergebnisse belegten IL-22 als potenten Verstärker der IFN γ -induzierten iNOS-Expression. Daher sollte mit den folgenden Versuchen die Sekretion von IL-22 aus aktivierten PBMC näher untersucht und durch Informationen zur Sekretion von IL-22 im Kontext von Sepsis ergänzt werden.

3.2.1 IL-22-Sekretion in aktivierten humanen PBMC

Es ist bekannt, dass IL-22 primär von aktivierten T- und NK-Zellen produziert wird (siehe Kapitel 1.2.2). Zunächst sollte überprüft werden, ob nach einer generellen T-Zellaktivierung IL-22 nachzuweisen ist. Hierfür wurden frisch isolierte humane mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC) (siehe Kapitel 2.3.6) mit 1 μ g/ml oder 10 μ g/ml **Phytohäm-agglutinin** (PHA) für 24h stimuliert. Unstimulierte PBMC wurden als Kontrolle mitgeführt. Anschließend wurde die Sekretion von IL-22 mittels ELISA quantifiziert. Die Aktivierung der PBMC zeigte eine markante IL-22-Sekretion bei 10 μ g/ml PHA (Abbildung 3.10 A).

Neben proinflammatorischen Zytokinen können PBMC auch über deren *Toll-like-Rezeptoren* (TLR) durch verschiedene *pathogen associated molecular patterns* (PAMP) selektiv aktiviert werden. Um den Einfluss solcher Moleküle auf die IL-22-Sekretion zu testen, wurden die PBMC für 16h mit folgenden TLR-Liganden und proinflammatorischen Zytokinen stimuliert:

LPS	1µg/ml	(TLR4)
Flagellin	100ng/ml	(TLR5)
pl:C	100µg/ml	(TLR3)
<i>S. epidermidis</i>	1:10000 (Stammlösung: 20 x 10 ⁹ Organismen/ml)	(TLR2)
Zytokin-Mix	à 50ng/ml (IL-1β, TNFα, IL-18)	
IFNγ	10ng/ml	

Das hitzeinaktivierte *Staphylococcus epidermidis*-Lysat wurde freundlicherweise von Prof. Charles Dinarello (University of Colorado, Health Sciences Center) zur Verfügung gestellt. Zusätzlich wurden unstimulierte PBMC als Kontrolle mitgeführt. Auch hier wurde die Sekretion von IL-22 in Zellkulturüberständen mittels ELISA quantifiziert. Das Ergebnis zeigt Abbildung 3.10 B und macht deutlich, dass nach Stimulation mit LPS, Flagellin, *S. epidermidis* und einer Kombination proinflammatorischer Zytokine (IL-1β, TNFα, IL-18) eine signifikante IL-22-Produktion erfolgte, wobei die Sekretion durch *S. epidermidis* am stärksten ausgeprägt war. Diese Daten zeigen, dass sowohl PHA als genereller T-Zell-aktivator sowie verschiedene Stimuli der angeborenen Immunität eine IL-22-Produktion anregen.

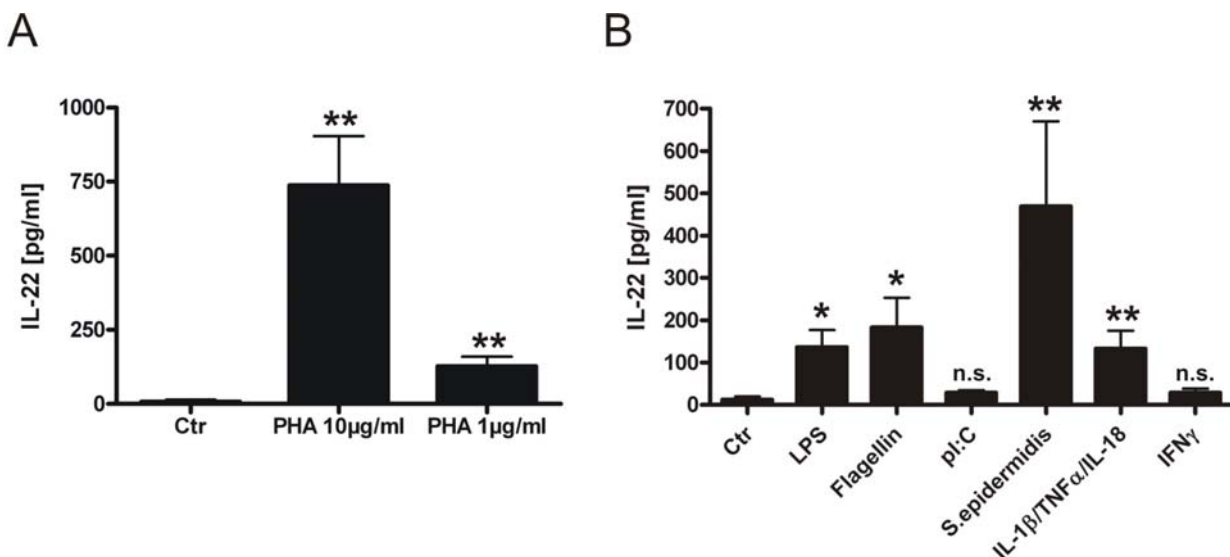


Abbildung 3.10 Induktion der IL-22-Sekretion durch PHA, TLR-Liganden und proinflammatorische Zytokine. (A) PBMC wurden mit 1µg/ml oder 10µg/ml PHA für 24h inkubiert. Unstimulierte PBMC wurden als Kontrolle mitgeführt. Anschließend wurde die Sekretion von IL-22 in Zellkulturüberständen mittels ELISA bestimmt (n=5; Darstellung als Mittelwerte ± SEM; **p<0,01 (Mann-Whitney-Test)). (B) PBMC wurden für 16h mit LPS (1µg/ml), Flagellin (100ng/ml), pl:C (100µg/ml), *S. epidermidis* (1:10000; Stammlösung: 20 x 10⁹ Organismen/ml), Zytokin-Mix (à 50ng/ml IL-1β, TNFα, IL-18) und IFNγ (10ng/ml) stimuliert. Unstimulierte PBMC wurden als Kontrolle mitgeführt. Die Sekretion von IL-22 wurde anschließend in Zellkulturüberständen mittels ELISA quantifiziert (n=6; Darstellung als Mittelwerte ± SEM; *p<0,05; **p<0,01 (Mann-Whitney-Test)).

Da die Stimulation mit *S. epidermidis* sehr potent war, wurde für die nächsten Versuche ausschließlich dieser Stimulus verwendet. Zunächst war es notwendig, den optimalen Zeitpunkt für die *S. epidermidis*-induzierte Sekretion von IL-22 zu erfassen. Hierfür wurden PBMC mit *S. epidermidis* (1:10000; Stammlösung: 20×10^9 Organismen/ml) inkubiert und die RNA wurde nach 6h, 16h, und 24h isoliert. Anschließend wurde die IL-22 mRNA-Expression durch semiquantitative *real time*-PCR bestimmt und auf die GAPDH-mRNA normiert (Abbildung 3.11 A). Zusätzlich wurde eine klassische PCR zum visuellen Nachweis der IL-22-mRNA und der GAPDH-mRNA durchgeführt (Abbildung 3.11 B). In der *real time*-PCR war eine maximale IL-22-Sekretion der aktivierten PBMC nach 16h nachzuweisen, während die IL-22 mRNA-Expression nach 24h wieder rückläufig war.

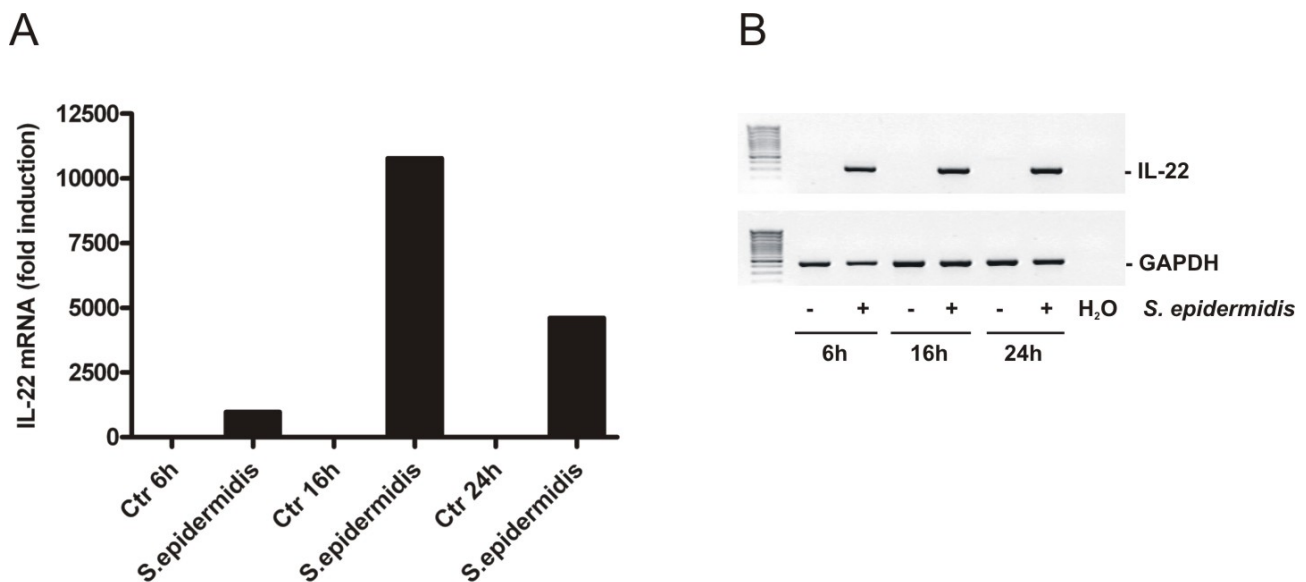


Abbildung 3.11 Kinetik der *S. epidermidis*-induzierten IL-22-Sekretion. PBMC wurden mit *S. epidermidis* (1:10000; Stammlösung: 20×10^9 Organismen/ml) inkubiert und nach 6h, 16h, und 24h wurde die RNA isoliert. **(A)** Die IL-22 mRNA-Expression wurde durch semiquantitative *real time*-PCR bestimmt und auf die GAPDH-mRNA normiert. **(B)** Für den visuellen Nachweis der IL-22-mRNA und GAPDH-mRNA wurde eine klassische PCR durchgeführt. **(A, B)** Für alle Ansätze wurden unstimulierte PBMC als Kontrolle mitgeführt.

3.2.2 Dexamethason hemmt die IL-22-Sekretion in aktivierten humanen PBMC

Die Behandlung der Sepsis gestaltet sich aufgrund fehlender potenter Therapiemöglichkeiten schwierig. Die Verabreichung niedrig dosierter Glukokortikoide gilt dabei als eine therapeutische Option. Infolgedessen sollte geklärt werden, ob Glukokortikoide wie Dexamethason in der Lage sind, die IL-22-Sekretion als Teil der Entzündungsantwort aktivierter

PBMC zu unterdrücken. Für diese Experimente wurden frisch isolierte humane PBMC mit *S. epidermidis* (1:10000; Stammlösung: 20×10^9 Organismen/ml) stimuliert. Gleichzeitig wurden die PBMC wie angegeben mit jeweils 50nM oder 100nM Dexamethason inkubiert. Unstimulierte PBMC wurden als Kontrolle mitgeführt. Nach 16h wurde zunächst die IL-22 mRNA-Expression sowohl mittels Standard-PCR (Abbildung 3.12 A) als auch mittels semiquantitativer *real time*-PCR bestimmt (Abbildung 3.12 B). Die Zellkulturüberstände derselben Versuchsansätze wurden verwendet, um die Konzentration an sezerniertem IL-22 mittels ELISA zu bestimmen (Abbildung 3.12 C). Es konnte eindrucksvoll gezeigt werden, dass Dexamethason sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene ein sehr potenter Inhibitor der *S. epidermidis*-induzierten IL-22-Sekretion ist. Da es bei der Hemmung der IL-22-Sekretion keinen Unterschied zwischen 50nM bzw. 100nM Dexamethason gab, sollte in einem weiteren Versuch die Wirkung von Dexamethason in wesentlich niedrigeren Konzentrationen überprüft werden. Hierfür wurden frisch isolierte humane PBMC mit *S. epidermidis* (1:10000; Stammlösung: 20×10^9 Organismen/ml) stimuliert und simultan mit den jeweils angegebenen Konzentrationen an Dexamethason inkubiert. Nach 16h wurde die Konzentration an sezerniertem IL-22 mittels ELISA quantifiziert. Dieser Versuch machte deutlich, dass 50nM Dexamethason die IL-22-Sekretion signifikant hemmen konnte (Abbildung 3.12 D). Auch 10nM, 5nM und 1nM Dexamethason bewirkten eine deutliche Tendenz hinsichtlich einer Reduktion der IL-22-Sekretion, die allerdings in den vorliegenden Experimenten keine Signifikanz erreichte.

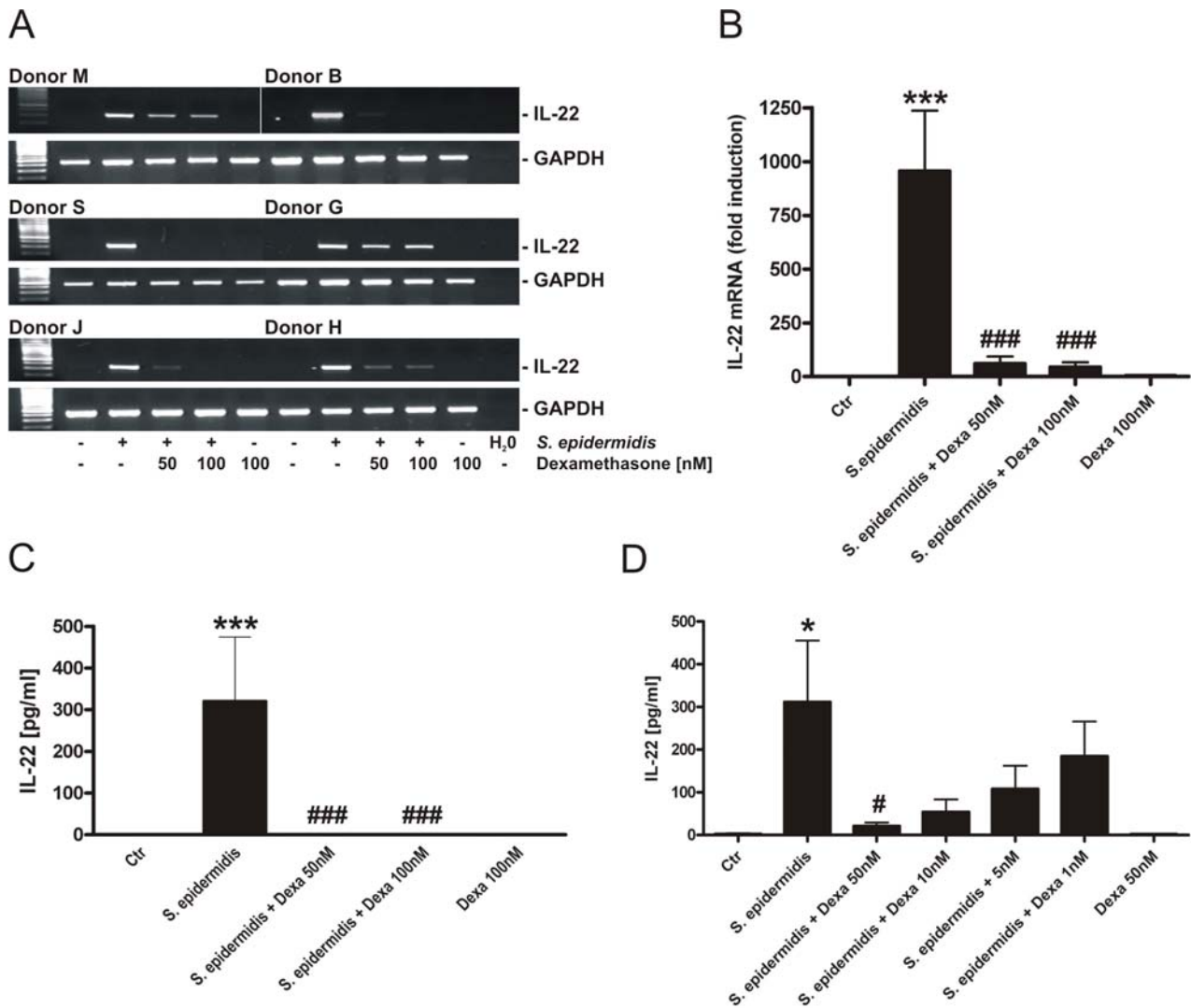


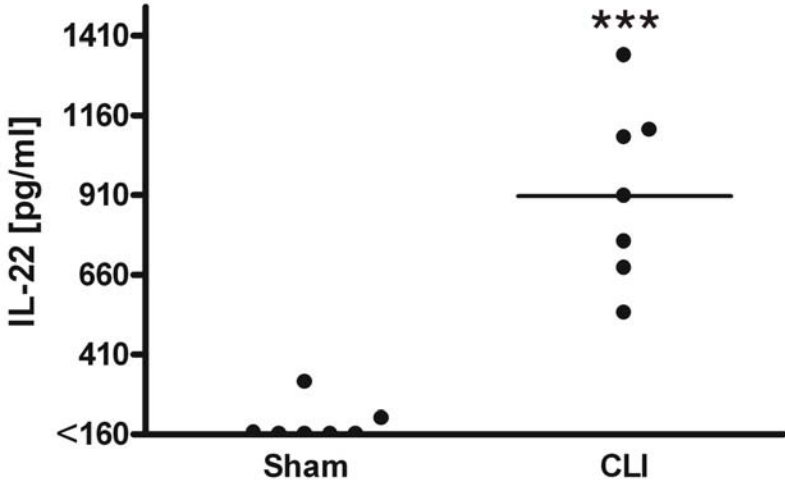
Abbildung 3.12 Dexamethason ist ein potenter Inhibitor der *S. epidermidis*-induzierten IL-22-Sekretion. (A, B, C) Frisch isolierte humane PBMC wurden mit *S. epidermidis* (1:10000; Stammlösung: 20×10^9 Organismen/ml) stimuliert. Gleichzeitig wurden die PBMC wie angegeben mit jeweils 50nM oder 100nM Dexamethason inkubiert. Nach 16h wurde die IL-22 mRNA-Expression sowohl mittels Standard-PCR (**A**) als auch mittels semiquantitativer *real time*-PCR (**B**) bestimmt ($n=6$; Darstellung als Mittelwerte \pm SEM der x-fachen Induktion im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle; *** $p<0,005$ verglichen mit unstimulierter Kontrolle; ### $p<0,005$ verglichen mit *S. epidermidis* (ANOVA/Bonferroni's multipler Vergleichstest)). (**C**) Die IL-22-Sekretion in den Zellkulturüberständen derselben Versuchsansätze wurde mittels ELISA quantifiziert ($n=6$; Darstellung als Mittelwerte \pm SEM; *** $p<0,005$ verglichen mit unstimulierter Kontrolle; ### $p<0,005$ verglichen mit *S. epidermidis* (Mann-Whitney-Test)). (**D**) Frisch isolierte humane PBMC wurden mit *S. epidermidis* (1:10000; Stammlösung: 20×10^9 Organismen/ml) stimuliert und simultan mit den jeweils angegebenen Konzentrationen an Dexamethason inkubiert. Nach 16h wurden die IL-22-Sekretion mittels ELISA quantifiziert ($n=4$; Darstellung als Mittelwerte \pm SEM; * $p<0,05$ verglichen mit unstimulierter Kontrolle; # $p<0,05$ verglichen mit *S. epidermidis* (Mann-Whitney-Test)). (**A-D**) Unstimulierte PBMC wurden in allen Ansätzen als Kontrolle mitgeführt.

3.2.3 Dexamethason hemmt die IL-22-Sekretion im akuten Modell der schweren Sepsis in Ratten

In der Literatur finden sich verschiedene Tiermodelle, um die Parameter der Sepsis sowie mögliche Therapiemaßnahmen zu untersuchen. Wichtig ist hier die klare Trennung zwischen Sepsis und Endotoxämie als jeweils eigenständige Entitäten [259]. Bei einer Endotoxämie wird durch Gabe von LPS eine „sterile Infektion“ verursacht, welche nicht der klinischen Situation einer Sepsis entspricht. Wichterman et al. bezweifeln die Relevanz eines experimentellen endotoxischen Schocks in Bezug auf die klinischen Probleme einer Sepsis [259]. Sie stellen gänzlich in Frage, ob experimentelle Befunde eines Endotoxämie-modells als Basis für weiterführende pharmakologische Therapieansätze im Sepsis-patienten geeignet sind.

Wichterman et al. benennen vier Möglichkeiten für die Induktion einer experimentellen Sepsis im Tiermodell. Hierzu zählen beispielsweise die intravenöse Infusion lebender Bakterienspezies oder ein intraperitoneales Inokulum einer definierten Bakterienkultur. Allerdings wäre ein chirurgischer Eingriff notwendig, um die Situation im septischen Patienten adäquat widerspiegeln zu können.

Um die in Kapitel 3.2.2 beschriebenen *in vitro*-Versuche sinnvoll durch *in vivo*-Experimente zu ergänzen, wurde ein kürzlich etabliertes Modell der akuten schweren Sepsis in Ratten unter Mithilfe von Dr. Patrick Scheiermann verwendet [251]. Das Modell der *caecum ligation and incision* (CLI; Ligation und Inzision des Caecum) verursacht eine bakterielle Peritonitis mit späterer systemischer Entzündung und Organdysfunktion. Die Behandlung der 14 männlichen Sprague-Dawley Ratten erfolgte wie in Kapitel 2.6.1 und 2.6.2 beschrieben. Ziel dieses Versuchsansatzes war es, zu ermitteln, ob im Modell der CLI erhöhte IL-22-Plasmaspiegel nachgewiesen werden können. In einer Arbeit von Weber et al. ist eine robuste Induktion der IL-22 mRNA-Expression im Verlauf einer murinen Peritonitis zu beobachten [260]. Für die in Abbildung 3.13 gezeigten Untersuchungen wurden Proben einer vorherigen Versuchsserie von Dr. Patrick Scheiermann verwendet [251]. Die Quantifizierung der IL-22-Sekretion im Blutplasma der Ratten erfolgte mittels ELISA. In Abbildung 3.13 ist eindrucksvoll gezeigt, dass IL-22 im Blutplasma von CLI-Tieren im Vergleich zu Sham-Tieren (diese Tiere erhielten keine CLI-Behandlung nach der Laparotomie; siehe Kapitel 2.6 und [251]) signifikant erhöht ist. In Übereinstimmung mit den gewonnenen Daten von *S. epidermidis*-aktivierten humanen PBMC (siehe Abbildung 3.12) wird deutlich, dass eine akute Sepsis in Nagetieren tatsächlich mit einem erhöhten



MIP-2 α Signifikanz erreichte. Für IL-18 konnte aber eine deutliche Reduktion um 71,9% verzeichnet werden.

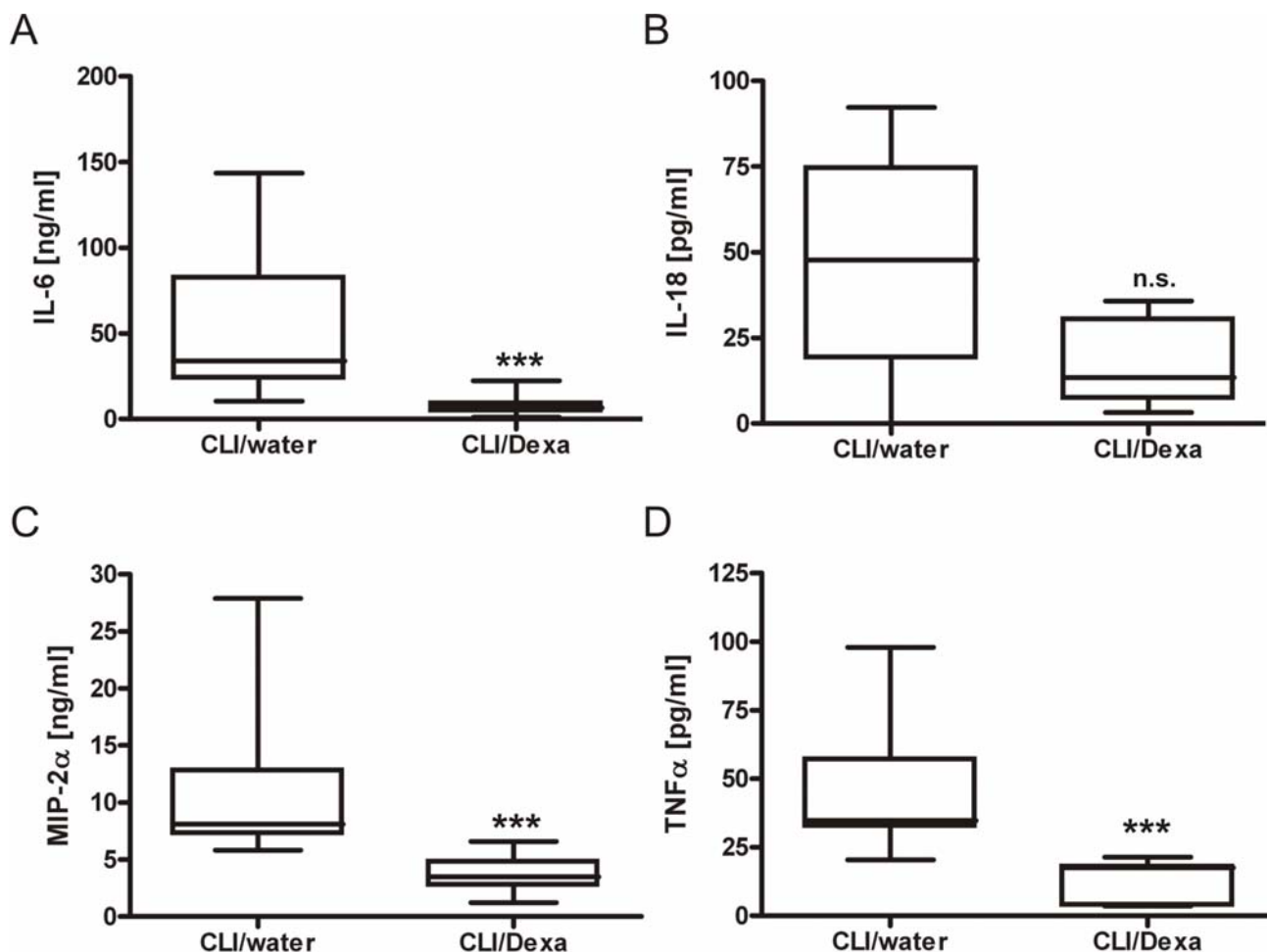


Abbildung 3.14 Dexamethason hemmt die Expression klassischer proinflammatorischer Zytokine bzw. Chemokine im CLI-Modell. (A-D) Die Behandlung der Tiere erfolgte wie in Kapitel 2.6.1/2.6.2 und [251] beschrieben. Die Quantifizierung von IL-6 (**A**), IL-18 (**B**), MIP-2 α (**C**) und TNF α (**D**) im Blutplasma erfolgte 390min nach CLI-Protokoll mittels ELISA. (n=7 je Gruppe; Darstellung als Box-Whisker-Plot mit Median, 25% Quartil, 75% Quartil und 95% Konfidenzintervall; Daten sind in pg/ml (**B, D**) oder ng/ml (**A, C**) gezeigt; ***p<0,005 verglichen mit CLI/water; n.s. nicht signifikant verglichen mit CLI/water (Mann-Whitney-Test))

Anschließend sollte die Wirkung von Dexamethason-21-phosphat-dinatriumsalz auf die IL-22-Produktion in CLI-behandelten Ratten bestimmt werden. Hierbei zeigte sich erstmalig, dass die Applikation von Glukokortikoiden in einer Dosis, die die Bildung klassischer Entzündungsparameter markant hemmt, gleichermaßen in einer massiven Reduktion der IL-22-Plasmaspiegel resultiert (Abbildung 3.15). Dieser Befund steht in Einklang mit den vorher gezeigten Effekten von Dexamethason hinsichtlich der IL-22-Sekretion in frisch isolierten humanen PBMC (Abbildung 3.12 A-D).

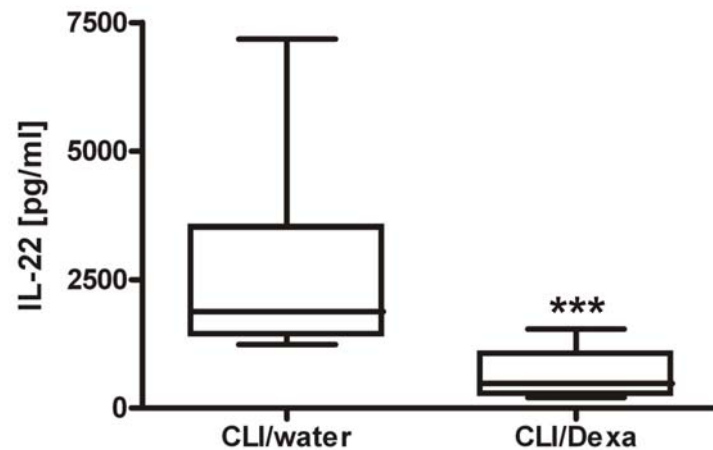


Abbildung 3.15 Dexamethason hemmt die IL-22-Expression im CLI-Modell. Die Behandlung der Tiere erfolgte wie in Kapitel 2.6.1/2.6.2 und [251] beschrieben. Die Quantifizierung der IL-22-Sekretion im Blutplasma erfolgte 390min nach CLI-Protokoll mittels ELISA. (n=7 je Gruppe; Darstellung als Box-Whisker-Plot mit Median, 25% Quartil, 75% Quartil und 95% Konfidenzintervall; ***p<0,005 verglichen mit CLI/water-Tieren (Mann-Whitney-Test))

Im nächsten Schritt sollte die mRNA-Expression von IL-22 und IL-17 als weiteres T_H17 -Zytokin im CLI-Modell genauer untersucht werden. Da die Milz ein hohes Vorkommen an Immunzellen aufweist, war sie von besonderem Interesse. Nach der RNA-Isolation wurde die mRNA-Expression von IL-22 und IL-17 mittels semiquantitativer *real time*-PCR analysiert. Mit dieser Methode konnte gezeigt werden, dass sowohl die IL-22-mRNA (Abbildung 3.16 A) als auch die IL-17-mRNA (Abbildung 3.16 B) in CLI-Tieren im Vergleich zu Sham-Tieren signifikant erhöht ist. Nach der Behandlung mit Dexamethason-21-phosphatdinatriumsalz konnte auch die klare Tendenz einer reduzierten IL-22 mRNA- (Abbildung 3.16 C) sowie einer IL-17 mRNA-Expression (Abbildung 3.16 D) beobachtet werden. Aber aufgrund einer zu geringen Individuenzahl pro Gruppe erreichte dieser Effekt keine Signifikanz. Generell zeigten die erhobenen Befunde aber auch eine relativ starke quantitative Variabilität.

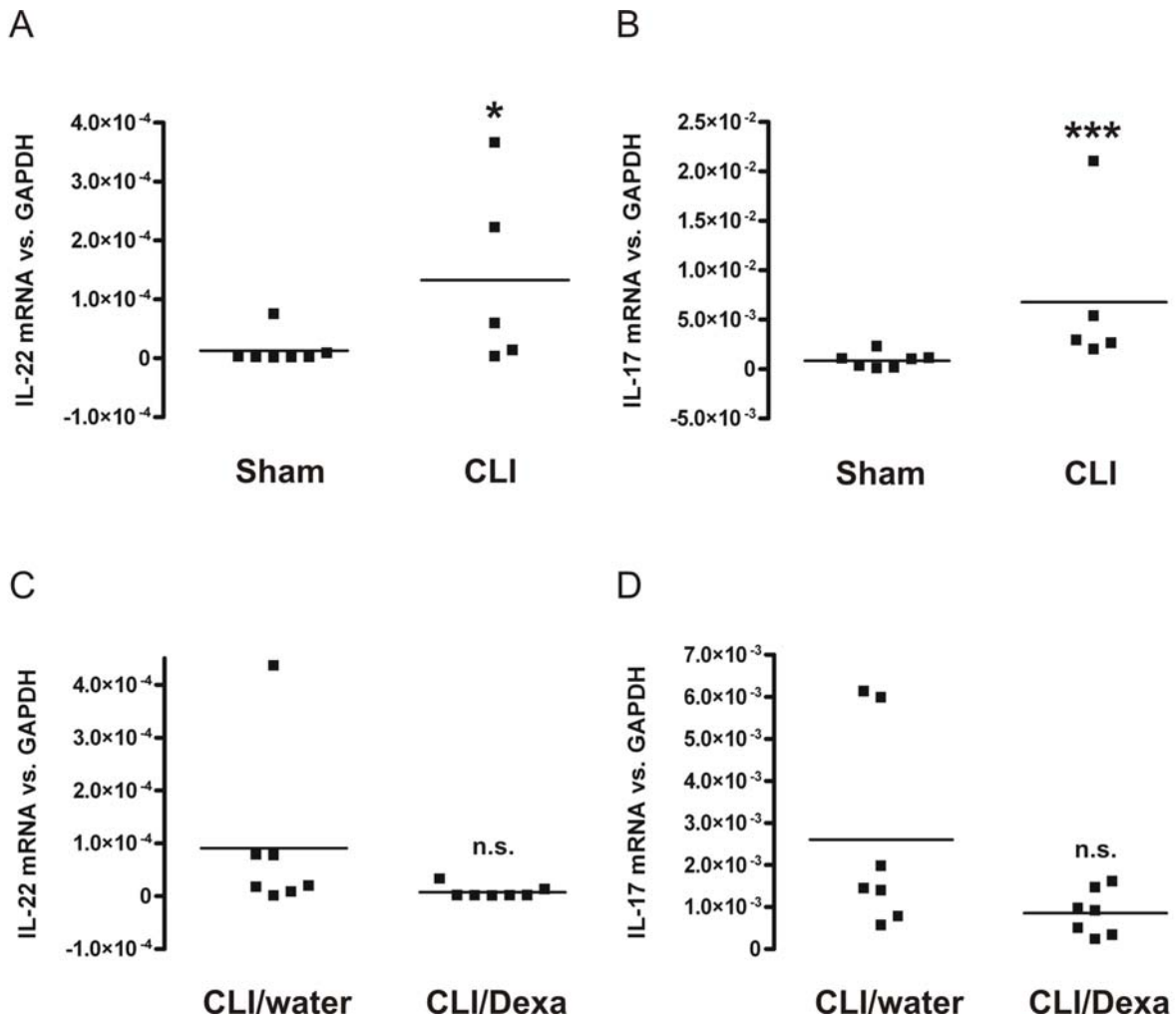


Abbildung 3.16 Analyse der mRNA-Expression von IL-22 und IL-17 im CLI-Modell. Die Behandlung der Tiere erfolgte wie in Kapitel 2.6.1/2.6.2 und [251] beschrieben. Mittels semiquantitativer *real time*-PCR wurde die mRNA-Expression von IL-22 (**A, C**) und IL-17 (**B, D**) in der Milz von Sham- bzw. CLI-Tieren und CLI/Wasser- bzw. CLI/Dexa-Tieren analysiert. (Sham: n=7; CLI: n=5; CLI/Wasser: n=7; CLI/Dexa: n=7; Darstellung als Scatter-Plot mit Mittelwert (Querbalken); *p<0,05 verglichen mit Sham; ***p<0,005 verglichen mit Sham; n.s. nicht signifikant verglichen mit CLI/water (Mann-Whitney-Test))

3.2.4 Die IL-22-Sekretion ist bei einer Peritonitis-bedingten Sepsis erhöht

Abschließend sollte überprüft werden, ob IL-22 in der humanen Sepsis nachzuweisen ist. Dieses Projekt war eine Kooperation mit OA Dr. Tobias Bingold (Klinik für Anästhesiologie, Intensivmedizin und Schmerztherapie; Universitätsklinikum Frankfurt). Er stellte uns freundlicherweise aliquotierte Serumproben von Sepsispatienten zur Verfügung. Bei allen Patienten ist eine schwere Sepsis mit einem abdominalen Fokus diagnostiziert worden. Das Blut wurde stets vor der Herdsanierung entnommen und mittels ELISA vermessen. Wie in Abbildung 3.17 eindrucksvoll zu sehen ist, wiesen die Patienten mit einer Peritonitis-

bedingten Sepsis eine massiv erhöhte IL-22-Sekretion ($292,6 \pm 88,83\text{pg/ml}$; $n=16$) verglichen mit gesunden Kontrolldonoren ($15,1 \pm 4,63\text{pg/ml}$; $n=21$) auf. Als weitere Kontrollgruppe wurde das Serum von Patienten vermessen, die einer modifizierten Whipple-Operation unterzogen wurden und bei denen keine Sepsis diagnostiziert worden war (Quelle: OA Dr. Tobias Bingold). Hierbei handelt es sich um einen Eingriff zur Entfernung von Teilen des Pankreas und des Duodenums sowie des Magenantrums als Folge eines Pankreaskopfkarzinoms. Diese Gruppe wurde als Nachweis verwendet, dass die IL-22-Sekretion nicht durch OP-bedingten Stress induziert werden kann ($30,45 \pm 13,45\text{pg/ml}$; $n=16$).

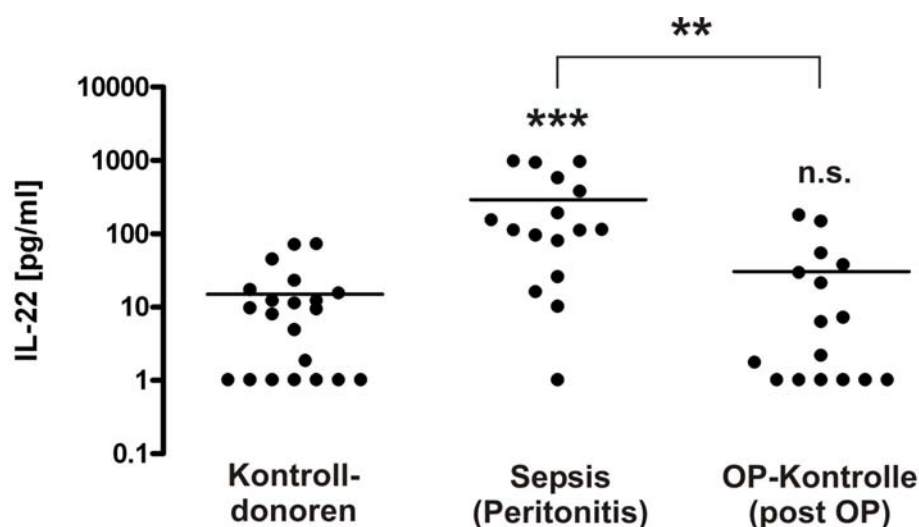


Abbildung 3.17 Die IL-22-Sekretion ist bei einer Peritonitis-bedingten Sepsis erhöht. Die Serumproben (Sepsis (Peritonitis) und OP-Kontrolle (post-OP)) wurden von OA Dr. Tobias Bingold (Klinik für Anästhesiologie, Intensivmedizin und Schmerztherapie; Universitätsklinikum Frankfurt) zur Verfügung gestellt. Bei allen Sepsispatienten ist eine schwere Sepsis mit einem abdominalen Fokus diagnostiziert worden. Das Blut wurde stets vor der Herdsanierung entnommen und mittels ELISA vermessen. Als Kontrollgruppen dienten gesunde Donoren und Patienten nach einer modifizierten Whipple-Operation. (Darstellung der absoluten Konzentrationen mit Mittelwert (Querbalken); Kontroll-donoren: $n=21//15,1$ (Mittelwert) $\pm 4,63\text{pg/ml}$ (SEM); Sepsis (Peritonitis): $n=16//292,6 \pm 88,83\text{pg/ml}$; OP-Kontrolle (post-OP): $n=16//30,45 \pm 13,45\text{pg/ml}$; ** $p<0,01$ siehe Klammer; *** $p<0,005$ verglichen mit Kontroll-donoren; n.s. nicht signifikant verglichen mit Kontroll-donoren (Kruskal-Wallis-Test))

4 Diskussion

4.1 IL-22 vermittelt über STAT3 die Induktion der iNOS-Expression in humanen epithelialen Kolonkarzinomzellen

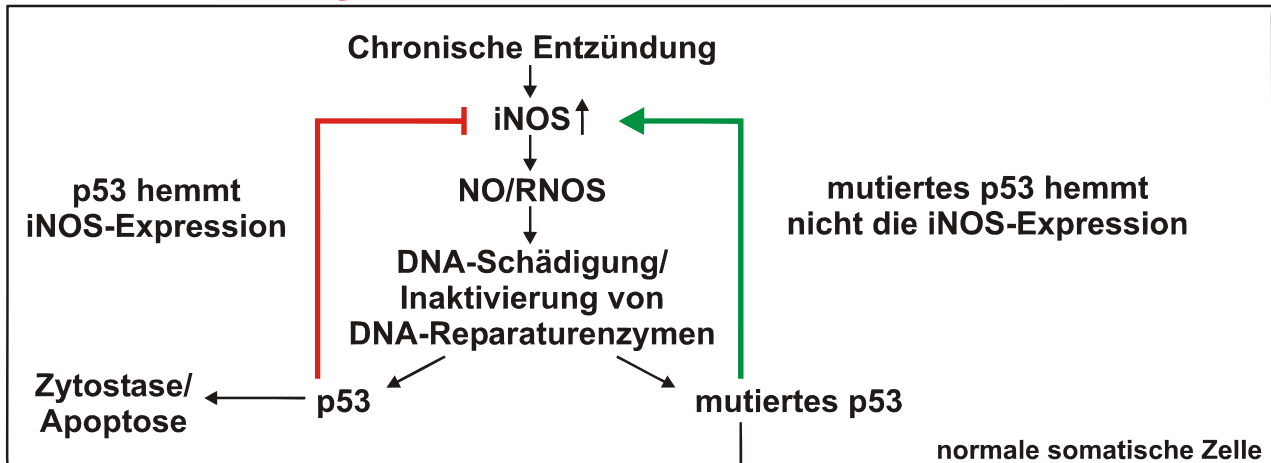
Die induzierbare NO-Synthase (iNOS) weist eine Verbindung zu pathologischen Prozessen auf, welche im Speziellen mit einer entzündungsbedingten Immunaktivierung in Zusammenhang stehen. Im Gegensatz zu den anderen Isoformen, der neuronalen sowie der endothelialen NO-Synthase, wird die iNOS-Aktivität über transkriptionelle und posttranskriptionelle Mechanismen reguliert. Diese Prozesse sind nicht nur den Zelltyp betrachtend spezifisch, sondern unterscheiden sich auch deutlich zwischen verschiedenen Spezies. Im Allgemeinen werden iNOS-Expression und -Aktivität in humanen Zellen kritischer kontrolliert als in Nagerzellen. Überdies gelten im humanen System Hepatozyten sowie epitheliale Zellen primär als Ursprung für iNOS-generiertes NO und nicht, wie beispielsweise in Nagetieren, Monozyten oder Makrophagen [131-133]. Das NO der Epithelzellen besitzt eine direkte autokrine Wirkung auf die epithelialen Zielstrukturen und so stehen sowohl die heilsamen Effekte als auch die potentiell schädigenden Konsequenzen der NO-Produktion im Rahmen einer Entzündung im engen Kontext mit dem Ausmaß und der Regelmäßigkeit der NO-Exposition. Eine chronische und permanente NO-Produktion kann mit einer direkten Reaktion zwischen NO oder reaktiven NO-Verbindungen und zellulären Strukturen assoziiert sein. Es wird weitläufig angenommen, dass dieser letzte Schritt eine zentrale Rolle in der Entstehung chronisch entzündlicher Erkrankungen und im Speziellen der Karzinogenese einnimmt. Entsprechend kann eine erhöhte Expression der iNOS bei chronisch entzündlichen Erkrankungen sowie maligner Entartungen nachgewiesen werden [167, 169]. Dies trifft insbesondere für intestinale Tumoren zu. Im Kolorektalkarzinom ist beispielsweise eine erhöhte iNOS-Expression in Tumorepithelzellen nachweisbar [180, 194]. Auch eine ausgeprägte Nitrierung, insbesondere von Tyrosinresten, durch Peroxynitrit kann im intestinalen Tumor gezeigt werden und deutet auf eine vermehrte iNOS-Aktivität hin [180, 182]. Obwohl die Rolle der iNOS in der Tumorbio-logie möglicherweise sowohl vom Tumor als auch von der Menge an sezerniertem NO abhängt, deutet doch die Gesamtheit der Hinweise darauf hin, dass iNOS/NO als Para-

meter der Tumorprogression im humanen Kolorektalkarzinom angesehen werden kann [114, 264].

Verschiedene Mechanismen sind für die tumorfördernden Effekte des NO verantwortlich. In Anbetracht des Zusammenhanges zwischen Entzündung und Kolonkarzinogenese [169, 265] dürften hier die proinflammatorischen Eigenschaften des NO eine wesentliche Rolle spielen. Ein wichtiger Aspekt dabei ist die Regulation der Tumorangiogenese [266]. So konnten beispielsweise einige Arbeitsgruppen zeigen, dass die iNOS-Expression im humanen Kolorektalkarzinom sowohl mit einer erhöhten intratumoralen Gefäßdichte als auch mit einer verstärkten Expression des proangiogenen *vascular endothelial growth factor* (VEGF) korreliert [180, 194]. Gleichfalls verdeutlichen Studien an kultivierten humanen DLD-1 Kolonkarzinomzellen, dass einerseits die Produktion proangiogener Mediatoren wie VEGF und CXCL-8 (IL-8) unter dem Einfluss von NO verstärkt wird, wohingegen die Expression antiangiogener Proteine wie CXCL-9 (MIG) oder CXCL-10 (IP-10) unterdrückt wird [201]. Zusätzlich steigert NO durch die Regulation des endothelialen Muskeltonus die Blutversorgung im Tumorgewebe [202].

Die Verstärkung der Metastasierung [194, 267] sowie der p53-Mutationsfrequenz [114, 268] sind weitere wichtige tumorfördernde Effekte des NO. Das DNA-Reparaturmolekül und Tumorsuppressorgen p53 ist essentiell für die zelluläre Antwort auf DNA-Schädigung, da es in diesem Fall den Zellzyklus während des G₁/S-Überganges blockiert. Sollte die dann initiierte DNA-Reparatur fehlschlagen, werden diese Zellen der Apoptose zugeführt. Wie bereits in Kapitel 1.5.3.1 erwähnt, verursacht die NO-vermittelte Deaminierung der DNA eine GC→AT-Transition. Solche und andere NO-induzierte DNA-Schäden resultieren in einer vermehrten Expression von p53, einem wichtigen *trans*-Repressor der iNOS-Expression, und einer verminderten NO-Produktion über einen regulatorischen negativen Rückkopplungsmechanismus [172, 269]. Eine GC→AT-Transition kann aber auch direkt im p53-Gen auftreten. Eine entsprechende Relation zwischen p53-Mutationen und iNOS-Expression ist unzweifelhaft in humanen Kolorektalkarzinomen sowie verschiedenen humanen Kolonkarzinomzelllinien nachgewiesen worden [268, 270]. Die fehlende Repressoraktivität des mutierten p53-Moleküls resultiert dann wiederum in einer gesteigerten iNOS-Expression mit erhöhter zellulärer NO-Produktion, weiterer DNA-Schädigung sowie der Entwicklung zusätzlicher transformierender Mutationen. Die Konsequenz ist ein Selektionsdruck, der zur Generierung von Tumorzellen führt, welche resistent gegenüber den zytotoxischen Eigenschaften des NO sind. Einen schematischen Überblick dieser komplexen Zusammenhänge gibt Abbildung 4.1 wieder.

Prozesse der Karzinogenese



Prozesse der Tumorprogression

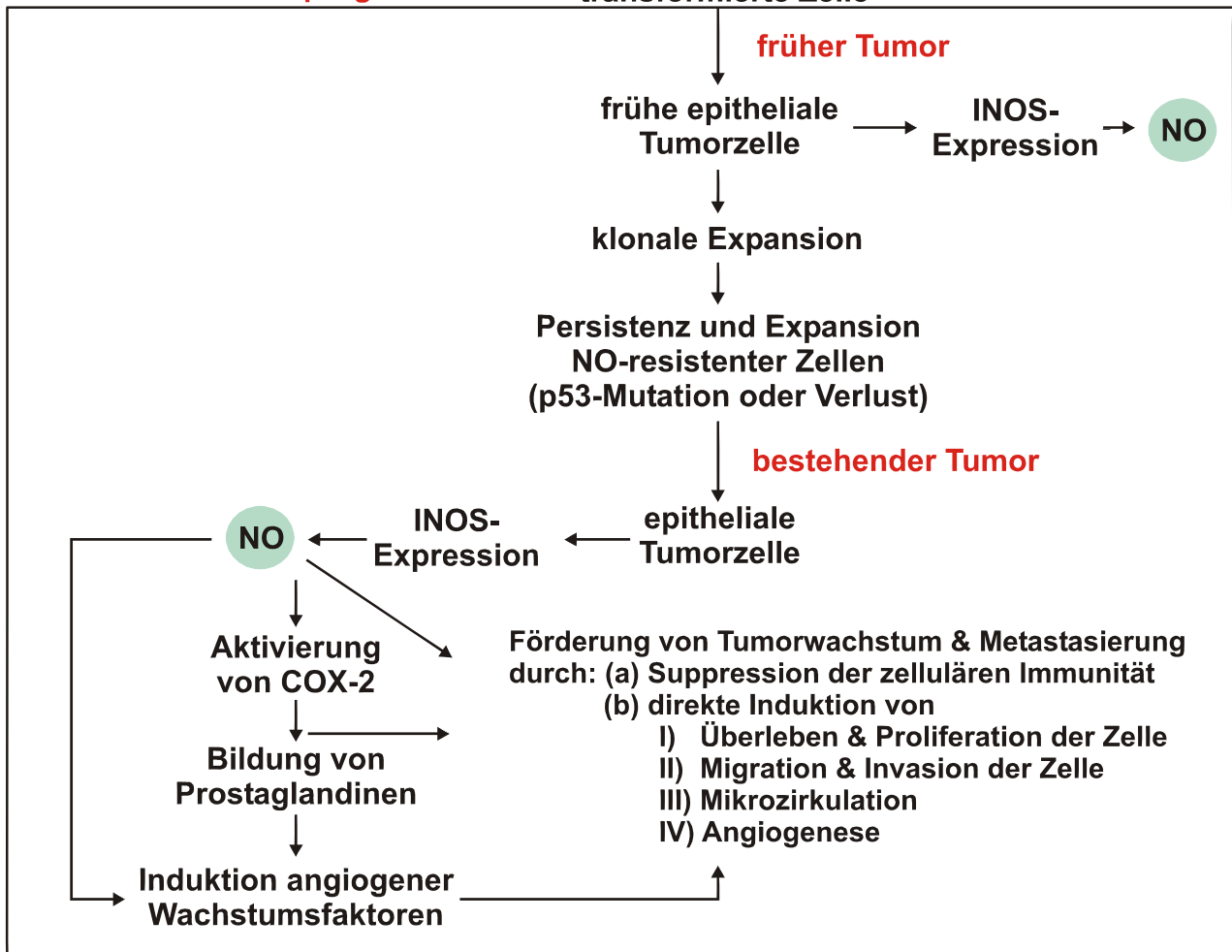


Abbildung 4.1 Die Rolle von iNOS/NO in der Karzinogenese und Tumorprogression. (Modifiziert nach [169, 264].)

Die Daten zur Funktion von iNOS/NO bei Karzinogenese und Tumorprogression im humanen Kolorektalkarzinom werden durch verschiedene Tiermodelle ergänzt. Diese zeigen eindrucksvoll, dass eine spezifische Hemmung der iNOS die Kolonkarzinogenese deutlich

reduziert [271, 272]. Aufgrund dessen ist es notwendig, die regulatorischen Mechanismen der iNOS-Expression in humanen epithelialen Kolonkarzinomzellen zu verstehen, um sie anschließend auf die *in vivo*-Situation des humanen Kolorektalkarzinoms zu übertragen. Diese Fragestellung wurde daher als Anlass genommen, in der vorliegenden Arbeit die Einflussnahme von IL-22 auf die Regulation der iNOS-Induktion eingehender zu untersuchen. Hierfür stellen die humanen epithelialen DLD-1 Kolonkarzinomzellen ein optimal charakterisiertes Zellkulturmodell dar. Tatsächlich basieren die ersten Berichte über die humane iNOS-Induktion auf Studien unter Verwendung dieser Zelllinie [273-275].

Es wurde bereits mehrfach in der Literatur beschrieben, dass DLD-1 Zellen sowie andere intestinale Epithelzellen wie Caco-2, Colo205, SW480, HCT116 und HT-29 den IL-22-Rezeptorkomplex exprimieren [66, 73] und somit bieten diese Zellen ein potentiell Ziel für die Wirkung von IL-22. Diesbezügliche Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit bestätigten die Expression sowohl der IL-22R1- als auch der IL-10R2-Rezeptorkette in DLD-1 Zellen (siehe Abbildung 3.1).

Alle bekannten Mitglieder der IL-10-Zytokinfamilie vermitteln ihre biologischen Funktionen über heterodimere Rezeptorkomplexe, die aus einer Typ I (R1)- und einer Typ II (R2)-Rezeptorkette bestehen. Diese Ketten ähneln sich in ihrer extrazellulären Domäne und gehören zur Zytokinrezeptorfamilie der Klasse 2 (*cytokine receptor family 2*, CRF2), welche ebenfalls die Rezeptoren der Typ I- und Typ II-Interferone umfasst [44-46]. In der Terminologie ist die R1-Rezeptorkette als die Kette mit der längeren intrazellulären Domäne definiert, die die Familie der *signal transducers and activators of transcription* (STAT) als Signalmoleküle und Transkriptionsfaktoren binden kann. Obwohl zurzeit neun Interleukine zur IL-10-Zytokinfamilie zählen, sind aktuell nur vier R1-Ketten und zwei R2-Ketten für diese Gruppe bekannt. Somit scheinen einige Zytokine der IL-10-Familie die Rezeptorketten gemeinsam zu nutzen. So hat sich beispielsweise herausgestellt, dass die R2-Rezeptorkette von IL-10 auch zum Rezeptorkomplex für IL-26, IL-28 α , IL-28 β und IL-29 gehört. Neben der gemeinsamen Nutzung einzelner Rezeptorketten nutzen einige Zytokine der IL-10-Familie (IL-19, IL-20, IL-24) auch identische Rezeptorkomplexe (IL-20R1/IL-20R2). Für die Zytokine IL-20 und IL-24 ist sogar beschrieben, dass sie sowohl an den IL-20R1/IL-20R2 Komplex als auch an den IL-22R1/IL-20R2-Komplex binden können [57].

Ein Marker für die Funktionalität des IL-22R1/IL-10R2-Rezeptorkomplexes ist die Phosphorylierung und die daraus resultierende Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT3, welcher in der Literatur als prominentes Signalmolekül für die Signaltransduktion von IL-22 beschrieben ist (siehe Kapitel 1.2.3). In dieser Arbeit wurde erstmals die biologische Aktivität des Rezeptorkomplexes in DLD-1 Zellen anhand einer zügigen und massiven Phosphorylierung von STAT3 unter dem Einfluss von IL-22 nachgewiesen (siehe Abbildung 3.2 A). Im Gegensatz hierzu ist die Phosphorylierung von STAT1 durch IL-22 eher schwach und im direkten Vergleich mit IFN γ ein zu vernachlässigender Faktor bei der Aktivierung dieses Transkriptionsfaktors (siehe Abbildung 3.2 D). Weitere wichtige Moleküle der intrazellulären Signaltransduktion sind die *mitogen-activated protein kinases* (MAPK). Hierzu zählen die *extracellular signal-related kinases* (ERK1/2), p38-Kinase und die *c-Jun N-terminal kinase* (JNK). Verschiedene Arbeitsgruppen haben in Abhängigkeit des gewählten Zellsystems zusätzlich die Aktivierung von ERK1/2, p38 sowie JNK durch IL-22 nachgewiesen. Brand et al. haben in humanen epithelialen HT-29 Kolonkarzinomzellen neben der Aktivierung von STAT1 und STAT3 ebenfalls eine Aktivierung der Kinasen ERK1/2 und JNK via IL-22 zeigen können [73]. Andere Untersuchungen in humanen subepithelialen intestinalen Myofibroblasten bestätigen, dass IL-22 neben STAT3 auch ERK1/2, p38 sowie JNK induzieren kann [59]. Auch in humanen synovialen Fibroblasten ist die Aktivierung von ERK1/2 und p38 durch IL-22 nachweisbar [60]. Dagegen kann in humanen Primärkeratinozyten nur eine überzeugende STAT3-Aktivierung durch IL-22 gezeigt werden [48]. Im Rahmen dieser Arbeit ist der Einfluss von IL-22 auf die Aktivierung weiterer Kinasen aufgrund anderer Schwerpunkte nicht untersucht worden.

Die Kernaussage der vorliegenden Arbeit ist der erstmalige Nachweis, dass IL-22 und IFN γ synergistisch die iNOS-Expression in DLD-1 Zellen induzieren [276]. Dies wurde sowohl auf mRNA-Ebene (siehe Abbildung 3.3) als auch auf Proteinebene (siehe Abbildung 3.4 A & B) nachgewiesen. Für DLD-1 Zellen ist bekannt, dass IFN γ als Einzelstimulus nur eine suboptimale iNOS mRNA-Expression im Vergleich zur Aktivierung durch einen Zytokin-Mix bestehend aus IFN γ , IL-1 β und TNF α erzielen kann [154, 277]. Auch IL-22 war in der vorliegenden Arbeit als Einzelstimulus nicht in der Lage, die iNOS mRNA-Expression zu induzieren. Der Nachweis des stabilen NO-Metaboliten Nitrit gilt als Parameter für die enzymatische Aktivität der iNOS. Dabei liegen die gemessenen Nitritkonzentrationen in humanen Zellen weit unter dem Niveau, welches für Nagerzellen üblich ist [278]. Eine Erklärung hierfür wurde bislang nicht gefunden. Die beobachtete zwei- bis

dreifache Steigerung der Nitritkonzentration durch IL-22 (siehe Abbildung 3.4 C) bestätigt frühere Arbeiten über die Zytokin-induzierte iNOS-Aktivität in DLD-1 Zellen nach optimaler Stimulation mit IL-1 β , TNF α und IFN γ [158]. Um diesen Befund in DLD-1 Zellen zu vervollständigen, ist zusätzlich der Effekt von IL-22 auf die iNOS-Expression in einer weiteren Kolonkarzinomzelllinie untersucht worden. Hierfür wurden Caco-2 Zellen gewählt, welche ebenfalls IL-22R1-positiv [66, 73] und somit potentiell IL-22-responsiv sind. DLD-1 Zellen gelten als schwach differenziert aber hoch invasiv, wohingegen Caco-2 Zellen gut differenzierte Kolonkarzinomzellen darstellen, welche ein geringes invasives Potential besitzen [279]. Die Verstärkung der iNOS-Expression durch IL-22 kann auch in Caco-2 Zellen beobachtet werden (siehe Abbildung 3.4 D). Dies erlaubt die Annahme, dass der gefundene IL-22-vermittelte Regulationsmechanismus unabhängig vom Differenzierungsstatus des gewählten Zellkulturmodells ist.

Aufgrund der Tatsache, dass STAT3 bei der IL-22-vermittelten Signaltransduktion dominiert, wurde für diesen Transkriptionsfaktor eine Schlüsselfunktion in der IL-22-induzierten Zunahme der iNOS-Expression angenommen. Um hierbei die Rolle von STAT3 zu untersuchen, wurde die Expression des Transkriptionsfaktors unter Verwendung einer spezifischen siRNA gehemmt. Diese Versuche zeigen sehr eindrucksvoll, dass STAT3 für die iNOS-Induktion unter dem Einfluss von IL-22 essentiell ist (siehe Abbildung 3.5). Der aktuelle Wissensstand über die Rolle von STAT3 bei der Regulation der humanen iNOS-Transkription ist eher unvollständig. Diese Arbeit zeigt aber, dass STAT3 ein entscheidender Faktor in der humanen iNOS-Expression in DLD-1 Zellen ist. In Übereinstimmung mit diesen Daten wurde kürzlich publiziert, dass der nukleär lokalisierte EGFR mit STAT3 interagiert und so die iNOS-Transkription in humanen Mammakarzinomzellen (MDA-MB-468) aktiviert. Zusätzlich ist die Überexpression einer biologisch aktiven STAT3-Mutante ausreichend, um die Aktivierung des humanen iNOS-Promotors in HeLa-Zellen zu initiieren [185]. Bereits 1993 wurde berichtet, dass IL-6 ebenfalls die IFN γ /IL-1 β -induzierte Nitritproduktion in DLD-1 Zellen signifikant verstärken kann [273]. Damals wurde aber der molekulare Mechanismus hinsichtlich einer möglichen Funktion von STAT3 nicht näher untersucht. Zwischen dem proinflammatorischen Zytokine IL-6 und IL-22 besteht eine enge Verwandtschaft hinsichtlich der von ihnen ausgelösten Signaltransduktion. Wie IL-22 ist auch IL-6 ein effizienter Aktivator des Transkriptionsfaktors STAT3 [239]. In der vorliegenden Arbeit konnte bestätigt werden, dass IL-6 ebenso wie IL-22 als Kostimulus der iNOS-Expression fungiert (siehe Abbildung 3.4 E). Daher kann angenommen werden,

dass neben IL-22 auch IL-6 diese Amplifikation aufgrund seiner potenten Aktivierung von STAT3 mediiert. Diese Beobachtung lässt auf einen transkriptionellen Mechanismus schließen, welcher für die Regulation der iNOS durch IL-22 verantwortlich ist. Anschließend durchgeführte *Luciferase*-Reporterstudien haben durchaus das Potential von IL-22 bestätigt, die humane iNOS-Promotoraktivität in DLD-1 Zellen zu erhöhen (siehe Abbildung 3.6). Eine direkte regulatorische Einheit zwischen IL-22, STAT3 und der iNOS-Promotoraktivität wird auch durch die Beobachtung gestützt, dass die iNOS-Expression bereits nach 4h Inkubation mit IL-22/IFN γ signifikant erhöht ist (siehe Abbildung 3.3 A) und es sich somit um einen rapiden Effekt handelt.

Die Signalwege, welche die iNOS-Expression auf transkriptioneller Ebene regulieren, variieren sowohl in verschiedenen Zellen als auch in unterschiedlichen Spezies. Im Allgemeinen zählt die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF κ B sowie STAT1 α zu den wichtigsten Schritten bei der Regulation der iNOS-Expression (siehe Kapitel 1.5.2).

EMSA-Analysen zeigen eine Basalaktivität an NF κ B in DLD-1 Zellen, welche tendenziell weiter durch IL-1 β /TNF α (siehe Abbildung 3.7 B; Spur 7) oder IFN γ /IL-1 β /TNF α [146] verstärkt werden kann. Dagegen ist die IL-22/IFN γ -induzierte iNOS-Expression nicht mit einer gesteigerten NF κ B-Aktivität assoziiert (siehe Abbildung 3.7 B; Spur 5). Daher wird in DLD-1 Zellen für NF κ B die Rolle eines „basalen“ Transkriptionsfaktors angenommen.

Ebenfalls enthält der iNOS-Promotor eine Bindungsstelle für den IFN γ -regulierten Transkriptionsfaktor STAT1 α . Eine Exposition der Zellen mit IFN γ resultiert in der Induktion einer STAT1 α -abhängigen iNOS-Expression durch Bindung der gebildeten STAT1 α -Homodimere an die GAS-Elemente (*γ activated sites*) [147]. In DLD-1 Zellen kann jedoch im Vergleich zu IFN γ als Einzelstimulus keine zunehmende Aktivierung von GAS-Elementen im Kontext der IL-22-vermittelten iNOS-Induktion beobachtet werden (siehe Abbildung 3.7 C). Ein dritter wichtiger Parameter bezüglich der humanen iNOS-Regulation ist der Transkriptionsfaktor *Interferon regulatory factor-1* (IRF-1) [131]. Interessanterweise ist kürzlich publiziert worden, dass der aktivierte EGFR die Expression von IRF-1 in A431-Zellen via Phosphorylierung von STAT1 und STAT3 induzieren kann [280]. Dieses Ergebnis steht im Zusammenhang mit den Daten von Lo et al. bezüglich der EGFR/STAT3-vermittelten Aktivierung der iNOS-Expression [185] und wirft die Frage auf, ob IRF-1 auch nach Stimulation mit IL-22 möglicherweise via STAT3 aktiviert werden kann. Abbildung 3.7 A bestätigt die bereits bekannte Induktion von IRF-1 durch IFN γ . Auch IL-22 aktiviert minimal

die Expression von IRF-1, wobei die Kombination beider Zytokine keine weitere Verstärkung der IFN γ -induzierten IRF-1-Aktivierung zur Folge hat. Diese Befunde deuten darauf hin, dass eine IRF-1-Aktivierung als möglicher Mechanismus in der IL-22-vermittelten iNOS-Expression keine wesentliche Rolle zu spielen scheint.

Die *Luciferase*-Reporterstudien in Abbildung 3.6 haben deutlich gezeigt, dass IL-22 die humane iNOS-Promotoraktivität in DLD-1 Zellen erhöht. Somit kann eine Regulation der Transkription durch IL-22 angenommen werden. Dennoch vermag die vorliegende Arbeit die Frage nach den transkriptionellen Regulationsmechanismen einer IL-22-vermittelten iNOS-Expression in DLD-1 Zellen nicht zu beantworten. Es ist anzunehmen, dass die Hemmung eines einzelnen der drei genannten Faktoren (NF κ B, STAT1 α oder IRF-1) eine Reduktion der IL-22/IFN γ -induzierten iNOS-Expression zur Folge hat. Ein weiterer Aspekt ist die IL-22-assoziierte Bildung von STAT1/STAT3-Heterodimeren, welche von STAT1-Homodimeren abweichende zelluläre Funktionen vermitteln könnten.

Im humanen System treten markante Unterschiede zwischen der Promotoraktivität und der iNOS mRNA-Expression auf. Wie schon in Kapitel 1.5.2 beschrieben, ist in unstimulierten DLD-1 Zellen keine iNOS-mRNA nachweisbar, wohingegen eine Kombination aus IFN γ /IL-1 β /TNF α eine ausgeprägte Expression der iNOS-mRNA vermittelt. Im Gegensatz dazu zeigen *nuclear run-on*-Experimente interessanterweise eine signifikante Basalaktivität des iNOS-Promotors in unstimulierten DLD-1 Zellen, welche offenbar durch IFN γ /IL-1 β /TNF α nur begrenzt verstärkt werden kann [134, 159, 160]. Diese Befunde weisen darauf hin, dass die Regulation der iNOS mRNA-Stabilität prinzipiell eine wichtige Funktion bei der iNOS-Induktion übernimmt. Allerdings zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass IL-22 die iNOS-mRNA nicht stabilisieren kann (siehe Abbildung 3.8). Dies bekräftigt die Annahme, dass IL-22 auf transkriptioneller Ebene den iNOS-Promotor reguliert (siehe Abbildung 3.6).

Ein interessanter Aspekt wäre die Vorstellung, dass IL-22 generell die Induktion IFN γ -abhängiger Gene potenziert. Klassische Vertreter dieser Gruppe sind neben proinflammatorischen Proteinen wie IP-10/CXCL-10 [256] auch antiinflammatorische Proteine wie IL-18BP α [255]. Die Expression von IP-10/CXCL-10 wird in humanen Epithelzellen primär über NF κ B und STAT1 α kontrolliert [281], wohingegen die Induktion des IL-18BP α vorwiegend über STAT1 α gesteuert wird (Bachmann et al.; J Cell Mol Med, 2008; in press). Weder IL-22 als Einzelstimulus noch die Kombination mit IFN γ beeinflusst signifikant die

Expression von IP-10/CXCL-10 oder IL-18BPα (siehe Abbildung 3.9 A-C). Diese Beobachtungen stehen in Übereinstimmung mit vorher bereits diskutierten Daten über die mangelnde oder nur minimale Beeinflussung der Transkriptionsfaktoren NFκB oder STAT1α durch IL-22 in DLD-1 Zellen (siehe Abbildung 3.7 A-C). Hieraus ergibt sich, dass IL-22 kein genereller Verstärker der IFNγ-induzierten Genexpression ist, sondern vielmehr spezifisch an der iNOS-Expression in Kolonkarzinomzellen beteiligt zu sein scheint.

Eine intestinale Entzündung kann als Vorstufe eines Tumors betrachtet werden (Jaiswal 2001). Sowohl in Patienten mit *Morbus Crohn* [178, 242] als auch im humanen Kolorektalkarzinom [180, 194, 243, 244] wurde eine Überexpression von STAT3 und iNOS beschrieben. Dagegen beugt die Hemmung der iNOS-Expression in verschiedenen experimentellen Tiermodellen einer Kolitis [282] sowie der Entstehung eines Kolonkarzinoms [271, 272] vor. Die hier dargelegten Ergebnisse führen IL-22 als neue Zielstruktur der therapeutischen Einflussnahme hinsichtlich STAT3-abhängiger Gene wie beispielsweise der iNOS ein.

4.2 Interleukin-22 in der Sepsis

Sepsis ist ein komplexes Syndrom mit einem hohen Grad an Diversität, welches eine exakte Definition der Erkrankung erschwert. Besonders die Beobachtung, dass auch ohne Vorliegen einer nachweisbaren mikrobiellen Infektion ein der bakteriellen Sepsis ähnliches Krankheitsbild vorliegen kann, führte zu einer Vielzahl von Synonymen, die unterschiedlich gebraucht wurden. Eine amerikanische Konsensuskonferenz der Gesellschaft für Thoraxchirurgie und der Gesellschaft für Intensivmedizin definierte 1992 die Begriffe SIRS (**s**ystemic **i**nflammatory **r**esponse **s**ndrome), Sepsis, schwere Sepsis und septischer Schock anhand entsprechender klinischer Parameter [283], die in Tabelle 4.1 zusammengefasst sind. Demnach basiert die Sepsis auf einer systemischen Entzündung, die durch eine gesicherte Infektion verursacht worden ist. Zusätzlich weist die Sepsis ein einzigartiges Genexpressionsprofil auf, welches sich von einer nicht-infektiösen Entzündung (SIRS) deutlich unterscheidet [284]. Sepsis-spezifische Gene sind bereits vor dem Auftreten des klinischen Phänotyps nachweisbar. Die schwere Sepsis unterscheidet sich hiervon durch mindestens eine Organdysfunktion und der septische Schock beschreibt eine schwere Sepsis, die sich durch eine persistierende arterielle Hypotension

trotz adäquater Volumenzufuhr auszeichnet [285]. Dabei zeigt der septische Schock eine deutlich schlechtere Prognose als die schwere Sepsis.

I. Nachweis der Infektion

- Diagnose einer Infektion über den mikrobiologischen Nachweis oder durch klinische Kriterien

II. Systemisches inflammatorisches Response-Syndrom (SIRS)

- Fieber ($\geq 38^{\circ}\text{C}$) oder Hypothermie ($\leq 36^{\circ}\text{C}$)
- Tachykardie: Herzfrequenz $\geq 90/\text{min}$
- Tachypnoe: Atemfrequenz $\geq 20/\text{min}$ oder Hyperventilation ($\text{PaCO}_2 \leq 4,3\text{kPa} / \leq 33\text{mmHg}$)
- Leukozytose (≥ 12.000 Leukozyten/ μl) oder Leukopenie (≤ 4.000 Leukozyten/ μl) oder $\geq 10\%$ unreife Neutrophile im Differentialblutbild

III. Akute Organdysfunktion / Schwere Sepsis

- Akute Enzephalopathie: eingeschränkte Vigilanz, Desorientiertheit, Unruhe, Delirium
- Relative oder absolute Thrombozytopenie: Abfall der Thrombozyten innerhalb von 24h um mehr als 30% oder ≤ 100.000 Thrombozyten/ μl bei Ausschluss einer akuten Blutung
- Arterielle Hypotension: systolischer arterieller Blutdruck $\leq 90\text{mmHg}$ oder mittlerer arterieller Blutdruck $\leq 70\text{mmHg}$ für mindestens 1h trotz adäquater Volumenzufuhr bei Abwesenheit anderer Schockursachen
- Arterielle Hypoxämie: $\text{PaO}_2 \leq 10\text{kPa}$ ($\leq 75\text{mmHg}$) unter Raumluft oder ein $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ -Verhältnis von $\leq 33\text{kPa}$ ($\leq 250\text{mmHg}$) unter Sauerstoffverabreichung bei Ausschluss einer kardialen oder pulmonalen Vorerkrankung
- Renale Dysfunktion: Diurese $\leq 0,5\text{ml/kg/h}$ für mindestens 2h trotz ausreichender Volumensubstitution und/oder Anstieg des Serumkreatinins um das Doppelte des lokal üblichen Referenzbereichs
- Metabolische Azidose: Basenüberschuss ≤ -5 mmol/l oder Laktat $\geq 1,5\text{x}$ oberhalb des lokal üblichen Referenzbereichs
- **SIRS**: mindestens zwei Kriterien II
- **Sepsis**: Kriterium I und mindestens zwei Kriterien II
- **Schwere Sepsis**: Kriterium I, mindestens zwei Kriterien II und mindestens ein Kriterium III
- **Septischer Schock**: Kriterium I und mindestens zwei Kriterien II sowie für wenigstens 1h ein systolischer arterieller Blutdruck $\leq 90\text{mmHg}$ bzw. ein mittlerer arterieller Blutdruck $\leq 70\text{mmHg}$ oder ein notwendiger Vasopressoreinsatz, um den systolischen arteriellen Blutdruck $\geq 90\text{mmHg}$ oder den arteriellen Mitteldruck $\geq 70\text{mmHg}$ zu halten

Tabelle 4.1 Diagnosekriterien für SIRS, Sepsis, schwere Sepsis und septischen Schock. (Modifiziert nach [283].)

Trotz aller Fortschritte der modernen Medizin hat sich im 20. Jahrhundert die Letalität der Sepsis kaum verändert. Die 28-Tage-Sterblichkeit liegt bei einer schweren Sepsis zwischen 20 - 40% und steigt mit der Ausbildung eines septischen Schocks auf 40 - 80%

[286, 287]. Eine Sepsis ist nach dem Myokardinfarkt die häufigste Todesursache bei intensivmedizinisch betreuten Patienten in den Vereinigten Staaten. Jährlich erkranken dort 750.000 Menschen an einer schweren Sepsis, deren Verlauf für 210.000 Patienten tödlich ist [257, 258].

Generell resultiert die Sepsis aus einer unkontrollierten Immunantwort auf eine Infektion [224]. Lewis Thomas erkannte bereits 1972, dass „...die Mikroorganismen, die uns angreifen, eher eine Nebenrolle spielen ... vielmehr ist es unsere Antwort auf ihre Anwesenheit, was die Krankheit verursacht ... unser Arsenal an Abwehrmechanismen zur Bekämpfung der Bakterien ist so stark, dass wir uns einer größeren Gefahr aussetzen als die eigentlichen Verursacher.“ [288]. Vor etwa 20 Jahren wurde die massive proinflammatorische Reaktion des Organismus auf die Infektion als Ursache des septischen Schocks angenommen [289]. Diese Theorie basierte auf diversen Tiermodellen, welche unter heutigen Gesichtspunkten die klinische Situation im Menschen nicht widerspiegeln [290-292]. Hier wurden hohe Dosen an Endotoxin oder Bakterien verwendet und diese induzierten eine im Vergleich zum Menschen exponentiell höhere Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wie $\text{TNF}\alpha$ [292]. Tatsächlich verfolgten verschiedene klinische Studien Strategien, welche die proinflammatorische Immunantwort im septischen Schock spezifisch oder unspezifisch hemmen sollten. Hierzu zählten unter anderem die Hochdosistherapie mit Glukokortikoiden [293], die Verwendung von Endotoxin-Antikörpern [294-296], von $\text{TNF}\alpha$ -Antagonisten/Antikörpern [297, 298] sowie die des IL-1-Rezeptor-antagonisten [299]. All diese Studien zeigten keine Verbesserung der Überlebensrate und erhöhten in einigen Fällen sogar die Mortalität [297]. Roger C. Bone begründet die negativen Resultate der klinischen Sepsisstudien mit der vielfältigen Immunantwort des Patienten, welche sich nicht nur durch proinflammatorische sondern im Besonderen auch durch antiinflammatorische Prozesse auszeichnet [300] (siehe Kapitel 1.6.1). Neben der Hyperinflammation (SIRS), die in der Vergangenheit als alleinige Ursache für die Entwicklung von Sepsis und Organdysfunktion betrachtet worden ist, wird seit Mitte der 1990er Jahre angenommen, dass auch eine exzessive Gegenregulation mit überschießender Antiinflammation den Patienten vital bedrohen kann. Als Konsequenz ergibt sich daraus eine Immunparalyse bzw. Immunsuppression, die zu einer gesteigerten Infektanfälligkeit des an sich schon schwer erkrankten Organismus führt. Dieser Zustand wird als *compensatory anti-inflammatory response syndrome* (CARS) bezeichnet und begünstigt die Entstehung septischer Komplikationen [301]. Dieser Pathomechanismus wurde beim Design vieler Studien nicht berücksichtigt.

Ergänzend hierzu ist zu beobachten, dass der Zeitraum der Zytokinfreisetzung über die Dauer der Applikation spezifischer Zytokin(rezeptor)antagonisten bzw. –antikörper im Rahmen früherer negativ verlaufender Studien hinaus fortbestanden hat [302]. So wurde beispielsweise der $\text{TNF}\alpha$ -Antikörper in zwei gescheiterten Studien [303, 304] lediglich über drei Tage den Patienten verabreicht, wohingegen die Zytokinfreisetzung auch noch lange nach dem Abklingen der klinischen Symptome nachweisbar war. Auch galt bei einigen fehlgeschlagenen Studien eine Multiorgandysfunktion als Einschlusskriterium [293, 295, 296, 298, 305]. Da die Sepsis-assoziierte Mortalität direkt mit den Auswirkungen des Organversagens korreliert, gilt es als unwahrscheinlich, dass eine Verbesserung der Situation durch spezifische Intervention erreicht werden kann, wenn der Patient bereits durch ein- oder mehrfaches Organversagen irreversibel geschädigt ist.

Aktuelle Therapiestudien basieren daher auf einem möglichst frühen Eingreifen innerhalb der ersten Stunden nach Eintreten des septischen Schocks. Hierzu zählt die rechtzeitige Optimierung der Hämodynamik [306-311] und die Gabe entsprechender Antibiotika [312]. Eine frühzeitige zielgerichtete Therapie (*early goal-directed therapy*; EGDT) moduliert die Entzündung und resultiert in einer signifikanten Reduktion der Mortalität [306-311]. Zugleich wird auch die Wiederherstellung der Homöostase durch die Applikation niedrig dosierter Glukokortikoide favorisiert. Glukokortikoide werden aufgrund ihrer antiinflammatorischen Eigenschaften bereits seit langer Zeit in der Therapie der Sepsis eingesetzt. Ihr Stellenwert wird jedoch sehr kontrovers diskutiert. Eine Meta-Analyse [313] verschiedener Glukokortikoid-Studien hat gezeigt, dass kurzzeitige Anwendungen hoch dosierter Glukokortikoide (Methylprednisolon 30mg/kg KG [293]) keinen positiven Einfluss auf das Überleben einer schweren Sepsis haben und aufgrund der stark immunsuppressiven Wirkung die Mortalität eher erhöhen. Interessanterweise ist die Sepsis durch eine relative Nebennierenrinden-Insuffizienz charakterisiert, welche auch mit einer erhöhten Mortalität assoziiert ist [314, 315]. Höhere Mortalitätsraten sind vornehmlich in Sepsispatienten mit reduzierten Kortisolspiegeln beobachtet worden [316]. Diese Daten haben das Verständnis über den Einsatz von Glukokortikoiden in der Sepsistherapie verbessert. Im Gegensatz zu hoch dosierten Glukokortikoiden wirken niedrige (physiologische) Dosen von Hydrokortison (200-300mg täglich; 7 Tage) positiv auf die Genesung und reduzieren signifikant die Mortalität [317-322]. In einigen Studien war die Gabe niedrig dosierter Glukokortikoide mit einer Verbesserung der Hämodynamik sowie der Wirkung vasopressiver Medikamente verbunden [319, 321-323]. Die vaskulären Effekte der Glukokortikoide werden über verschiedene Mechanismen vermittelt. Es ist bekannt, dass Glukokortikoide die iNOS

hemmen [126, 145, 324, 325] und so die Produktion und Wirkung des Vasodilators NO unterdrücken. Zusätzlich verstärken Glukokortikoide die Expression adrenerger Rezeptoren, welche über einen negativen Rückkopplungsmechanismus durch die hohe Konzentration zirkulierender Katecholamine desensibilisiert worden sind [326, 327]. Dadurch wird die zelluläre Sensitivität gegenüber Vasopressoren verbessert.

Weitere aktuell diskutierte Therapiemöglichkeiten sind die Applikation von aktiviertem Protein C und eine intensive Insulintherapie.

Trotz dieser neuen Therapieansätze ist die klinische Situation weiterhin unbefriedigend und es ist unverändert notwendig, die pathophysiologischen Mechanismen der Sepsis weiter zu charakterisieren. Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit ein möglicher Zusammenhang zwischen IL-22 und Sepsis untersucht werden. Wie bereits in Kapitel 1 beschrieben, vermittelt IL-22 wichtige immunregulatorische Funktionen, welche mit Entzündung und Immunität in Verbindung stehen. Zu den IL-22-regulierten Genen zählen beispielsweise Akut-Phase-Proteine, β -Defensine, Matrixmetalloproteasen und, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, die iNOS. Zudem zeigen diverse Publikationen eine erhöhte Sekretion von IL-22 in experimentellen Tiermodellen zur Untersuchung bakterieller sowie viraler Infektionen (siehe Kapitel 1.4.2). Nach einer Infektion, welche die Grundlage der Sepsis bildet, wird die zunächst proinflammatorische Immunantwort durch die Bindung mikrobieller Produkte an TLR oder anderer PAMP-erkennender Strukturen initiiert. Häufig bei einer Sepsis auftretende gramnegative Bakterien sind *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* und *Pseudomonas aeruginosa*. Zu den grampositiven Bakterien zählen *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pneumoniae* sowie *Streptococcus enterococci* [328].

In der vorliegenden Arbeit sollte zunächst der Einfluss verschiedener TLR-Liganden sowie Phytohämagglutinin (PHA) als genereller T-Zellaktivator auf die IL-22-Sekretion in frisch isolierten humanen PBMC untersucht werden. Die Ergebnisse zeigen eine signifikante Erhöhung der IL-22-Sekretion nach Aktivierung der T-Zellen via PHA sowie nach Stimulation der angeborenen Immunität über LPS, Flagellin, einem hitzeinaktivierten *Staphylococcus epidermidis*-Lysat oder dem proinflammatorischen Zytokinmix IL-1 β /TNF α /IL-18 (siehe Abbildung 3.10 A & B). Hierbei vermittelt insbesondere die Inkubation mit *S. epidermidis* eine potente IL-22-Sekretion (siehe Abbildungen 3.10 B & 3.11). Auch Wolk et al. zeigen, dass sowohl LPS als auch ein hitzeinaktiviertes *Staphylococcus*

aureus-Lysat eine ähnliche IL-22-Sekretion in humanen PBMC zur Folge hat [48]. TLR-Liganden, T-Zellaktivatoren sowie proinflammatorische Zytokine spielen eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Sepsis (siehe Kapitel 1.6.1) [223, 224, 329, 330]. LPS galt lange Zeit als die Hauptkomponente einer durch gramnegative Bakterien induzierten Sepsis. Inzwischen ist aber auch die Rolle von Flagellin als proinflammatorisches Produkt motiler Bakterien belegt und im Blut von Sepsispatienten erhöht nachweisbar [331]. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Flagellin *in vitro* eine massive Expression der iNOS in intestinalen Epithelzellen induziert [332]. Somit aktiviert Flagellin nicht nur die IL-22-Sekretion in humanen PBMC, sondern reguliert gleichermaßen wie IL-22 die Induktion der iNOS-Expression in intestinalen Epithelzellen.

Da die hier verwendeten PBMC nicht weiter zu T_H17-Zellen ausdifferenziert wurden, ist anzunehmen, dass andere Zellpopulationen für die IL-22-Sekretion verantwortlich sind. Hierfür kommen vor allem NK-Zellen in Frage (siehe Kapitel 1.2.2). Diese Zellen exprimieren verschiedene TLR-Rezeptoren wie beispielsweise TLR2 (hitzeinaktiviertes *S. epidermidis*-Lysat), TLR4 (LPS) oder TLR5 (Flagellin) [214]. Kürzlich ist allerdings auch gezeigt worden, dass in unbehandelten humanen PBMC gesunder Donoren T_H17-Zellen nachweisbar sind [333]. In der Annahme, dass die in der vorliegenden Arbeit isolierten PBMC eine kleine Population an T_H17-Zellen beinhalten, sollte PHA diese T_H17-Zellen aktiviert und eine IL-22-Sekretion ausgelöst haben.

Bis heute ist noch nicht hinreichend geklärt, wie die Sekretion von IL-22 reguliert ist. Ebenfalls offen ist die Frage nach pharmakologischen Einflussmöglichkeiten. Da bei der Therapie einer Sepsis die Behandlung mit niedrig dosierten Glukokortikoiden Erfolg versprechend ist, wurde im Folgenden der Einfluss des klassischen antientzündlichen Pharmakons Dexamethason auf die IL-22-Sekretion in PBMC untersucht. Die antientzündlichen Effekte beruhen hierbei unter anderem auf einer Hemmung der Biosynthese verschiedener proinflammatorischer Zytokine [334-336]. In der vorliegenden Arbeit konnte im Zellkulturmodell humaner PBMC eindrucksvoll gezeigt werden, dass Dexamethason sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene einen sehr potenten Inhibitor der *S. epidermidis*-induzierten IL-22-Sekretion darstellt (siehe Abbildung 3.12 A-D).

Um die *in vitro*-Daten der IL-22-Sekretion nach Immunaktivierung humaner PBMC durch *in vivo*-Experimente zu ergänzen, wurde ein kürzlich etabliertes Rattenmodell der schweren Sepsis mit akutem Verlauf nach Scheiermann et al. verwendet [251]. Nagetiere werden in der Sepsisforschung sehr häufig als Modell genutzt [259, 291]. Während Mausmodelle für

ein breites Spektrum an molekularen Methoden zur Verfügung stehen, bieten experimentelle Rattenmodelle eine bessere Möglichkeit zur Untersuchung der Hämodynamik sowie der Organpathophysiologie.

In der Literatur finden sich verschiedene Tiermodelle, um die Parameter der Sepsis sowie mögliche Therapiemaßnahmen zu untersuchen. Wichtig ist hier aber die klare Trennung zwischen Sepsis und Endotoxämie als jeweils eigenständige Entitäten [259, 291]. Dieser wichtige Aspekt wird allerdings von einigen Arbeitsgruppen nicht bedacht. Bei einer Endotoxämie wird durch Gabe von LPS eine „sterile Infektion“ verursacht, welche nicht der klinischen Situation einer Sepsis entspricht. Wichterman et al. bezweifeln die Relevanz eines experimentellen endotoxischen Schocks in Bezug auf die klinischen Probleme einer Sepsis [259]. Sie stellen gänzlich in Frage, ob experimentelle Befunde eines Endotoxämie-modells als Basis für weiterführende pharmakologische Therapieansätze im Sepsis-patienten geeignet sind.

Wichterman et al. benennen mögliche Verfahren für die Induktion einer experimentellen Sepsis im Tiermodell. Hierzu zählen die intravenöse Infusion lebender Bakterienspezies oder ein intraperitoneales Inokulum einer definierten Bakterienkultur. Allerdings wäre ein chirurgischer Eingriff notwendig, um die Situation im septischen Patienten adäquat widerspiegeln zu können. Daher etablierten Wichtermann et al. in den 1980er Jahren ein Sepsismodell der Ligation und Punktion des Caecum (*caecum ligation and puncture*; CLP), welches eine kontinuierliche Freisetzung des Fäzes aus dem Caecum in das Abdomen zur Folge hat und somit eine „physiologische“ Mischflora als Quelle einer Infektion bietet [259]. Nachteile dieses weitläufig akzeptierten Modells sind allerdings die sehr langsame Sepsisprogression [337-339] und die Beeinflussung des Verlaufs durch die Punkturgröße [340, 341].

Um die in Kapitel 3.2.2 beschriebenen *in vitro*-Versuche sinnvoll durch *in vivo*-Experimente zu ergänzen, wurde ein kürzlich etabliertes Modell der akuten schweren Sepsis in Ratten unter Mithilfe von Dr. Patrick Scheiermann verwendet [251]. Aufgrund der Nachteile des CLP-Modells erarbeiteten Scheiermann et al. ein experimentelles Modell der schweren Sepsis mit akutem Verlauf sowie hoher Mortalität. Dieses chirurgische Modell der Ligation und Inzision des Caecum (*caecum ligation and incision*; CLI) basiert auf dem CLP-Modell nach Wichtermann et al. [259] und erfüllt die Sepsiskriterien der *International Sepsis Definitions Conference* [342]. Es verursacht aufgrund des Einschnittes im Caecum eine akute bakterielle Peritonitis mit nachfolgender systemischer Entzündung sowie Organ-

dysfunktion und imitiert somit optimal eine klinische schwere Sepsis, wie sie auch bei Intensivpatienten beobachtet wird [302, 343-345].

Zielsetzung der Untersuchungen war es abzuklären, ob IL-22 im CLI-Modell nachgewiesen werden kann und seine Freisetzung durch Dexamethason gehemmt wird. In Mäusen ist bereits eine verstärkte IL-22 mRNA-Expression während einer experimentellen septischen Peritonitis beobachtet worden [260]. Die Injektion von rekombinantem IL-22BP-Fc verbessert hierbei den Verlauf des klinischen Bildes. IL-22BP-Fc reduziert die bakterielle Last im Abdomen sowie entfernter Organe wie Leber und Niere. Weber et al. zeigen, dass IL-22BP-Fc die Produktion von IL-10 vermindert. Da IL-10 das Bakterienwachstum während einer experimentellen Peritonitis aufgrund immunsuppressiver Effekte fördert [346-348], wird angenommen, dass IL-22 eine Infektion über die positive Beeinflussung der IL-10-Expression unterstützt [260]. Diese Vermutung wird auch durch die bereits beobachtete Induktion der IL-10 mRNA-Expression in intestinalen Epithelzellen via IL-22 bestätigt [66].

Im Rahmen des CLI-Modells ist zunächst das Blutplasma hinsichtlich der Bildung von IL-22 untersucht worden. Dabei zeigte sich, dass das Plasma von CLI-Tieren im Vergleich zu Sham-Tieren signifikant erhöhte IL-22-Konzentrationen aufweist (siehe Abbildung 3.13). In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der *in vitro*-Experimente in humanen PBMC (siehe Abbildung 3.12 A-D) hat die Applikation von Dexamethason im CLI-Modell die Hemmung der IL-22-Produktion zur Folge (siehe Abbildung 3.15). Ergänzend dazu ist die Beeinflussung der Expression verschiedener klassischer Entzündungsparameter wie IL-6, IL-18, TNF α und MIP-2 α durch Dexamethason untersucht worden. Bezüglich dieser Parameter ist eine Hemmung durch Glukokortikoide bereits bekannt [334-336]. Es handelt sich hierbei um relevante Faktoren in der klinischen Sepsis (siehe Kapitel 1.6.1), die Rückschlüsse über das Ausmaß der septischen hyperinflammatorischen Phase geben [302, 343-345]. Auch bei diesen Zytokinen/Chemokinen ist die hemmende Wirkung von Dexamethason in CLI/Dexa-Tieren im Vergleich zu CLI/Wasser-Tieren sehr ausgeprägt (siehe Abbildung 3.14 A-D), wobei dieser Effekt nur bei IL-6, TNF α und MIP-2 α Signifikanz erreichte. Für IL-18 konnte aber eine deutliche Reduktion um 71,9% verzeichnet werden. Ein ähnliches Bild spiegelt sich auch auf mRNA-Ebene wider. Sowohl in Bezug auf IL-22 (siehe Abbildung 3.16 A) als auch auf IL-17 (siehe Abbildung 3.16 B) ist eine signifikante Erhöhung der mRNA-Expression in CLI-Tieren im Vergleich zu Sham-Tieren zu erkennen.

Auch hier wirkt die Applikation von Dexamethason tendenziell hemmend auf die mRNA-Expression von IL-22 (siehe Abbildung 3.16 C) und IL-17 (siehe Abbildung 3.16 D).

In der Literatur wird die Rolle von IL-22 in der Sepsis kontrovers diskutiert. Im Gegensatz zur bereits erwähnten Publikation von Weber et al. [260] zeigen andere Arbeiten, dass die bakterielle Last und die Epithelschädigung in IL-22-defizienten Mäusen nach oraler Infektion mit *Citrobacter rodentium* massiv zunimmt (siehe Kapitel 1.4.2) [111]. Hier wird die protektive Funktion von IL-22 auf die Induktion antimikrobieller Proteine zurückgeführt. In einem weiteren Modell wird durch die pharyngale Applikation einer definierten Dosis an *Klebsiella pneumoniae* in IL-22-defizienten Mäusen eine bakterielle Pneumonie mit hoher Letalität induziert (siehe Kapitel 1.4.2) [110]. In Übereinstimmung mit Zheng et al. [111] reguliert IL-22 hier die verstärkte antimikrobielle Aktivität der Epithelien durch die Induktion von Lipocalin-2 und erhöht so den transepithelialen Widerstand gegenüber der *K. pneumoniae*-induzierten Zellschädigung.

Das CLI-Modell initiiert aufgrund einer bakteriellen Infektion eine fulminante Aktivierung der angeborenen Immunität und induziert auf diese Weise eine potente IL-22-Sekretion. Die Verabreichung von Dexamethason reduziert sowohl *in vitro* als auch *in vivo* die IL-22-Expression. Glukokortikoide im Allgemeinen hemmen die Immunabwehr und stören somit auch die IL-22-vermittelte intestinale Immunität, welche von Zheng et al. [111] und Aujla et al. [110] beschrieben werden. Es wird angenommen, dass IL-22 die muköse Immunabwehr durch Induktion antimikrobieller Proteine erhöht. Gleichzeitig besitzt es scheinbar das Potential, einer bakteriellen Translokation durch Stabilisierung der epithelialen Vitalität entgegen zu wirken. Die hier gezeigten Daten lassen daher vermuten, dass Glukokortikoide entscheidende Aspekte der IL-22-vermittelten intestinalen Schutzfunktion zerstören. Diese negativen Konsequenzen erklären möglicherweise, weshalb eine hoch dosierte Glukokortikoidtherapie bei *Morbus Crohn*-Patienten mit einem erhöhten Auftreten von Abszessen und so mit einem höheren Risiko für postoperative Komplikationen wie einer abdominell-bedingten Sepsis assoziiert ist [349, 350].

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sowie andere Publikationen [260] haben den Nachweis erhöhter IL-22-Bildung in Peritonitismodellen erbracht. Daher sollten nun die hier vorgestellten Resultate mit dem humanen System verknüpft werden. In der hier aufgeführten Studie sind die IL-22-Konzentrationen im Serum von Patienten mit abdominell-bedingter Sepsis analysiert und sowohl mit gesunden Donoren als auch mit Patienten

nach einer modifizierten Whipple-OP verglichen worden (siehe Abbildung 3.17). Die Serumkonzentrationen von IL-22 sind in der Patientengruppe mit abdominell-bedingter Sepsis ($292,6 \pm 88,83\text{pg/ml}$; $n=16$) signifikant höher als bei gesunden Donoren ($15,1 \pm 4,63\text{pg/ml}$; $n=21$) bzw. Whipple/post-OP-Patienten ($30,45 \pm 13,45\text{pg/ml}$; $n=16$).

Das Serum der Patienten wurde in der Klinik für Anästhesiologie, Intensivmedizin und Schmerztherapie routinemäßig auf IL-6 sowie IL-10 als wichtige Sepsisparameter untersucht. In der hier vorgestellten Studie konnte keine Korrelation zwischen IL-22 und IL-6 bzw. IL-10 beobachtet werden, wobei hierfür auch die niedrige Zahl an Patienten ursächlich sein kann (Bingold et al.; unpublizierte Daten).

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung an Sepsispatienten wurden neben IL-22 zusätzlich die Serumkonzentrationen des *intestinal fatty acid binding protein* (I-FABP/ FABP2) analysiert. I-FABP gilt als Parameter für die frühe intestinale Epithelzellschädigung [351, 352]. Es wird ausschließlich von reifen Enterozyten im Intestinum exprimiert und die Freisetzung in die Blutzirkulation ist die Folge einer beeinträchtigten Membranintegrität aufgrund intestinaler Epithelzellschädigung [352]. Im Zusammenhang mit einer abdominell-bedingten Sepsis haben Derikx et al. nachgewiesen, dass erhöhte Plasmakonzentrationen an I-FABP mit einer signifikant verminderten Überlebensrate assoziiert sind [353]. Die Plasmaspiegel von I-FABP liegen bei gesunden Donoren in einem Bereich um 100pg/ml oder weniger und können bei nicht-überlebenden Patienten mit einer abdominell-bedingten Sepsis bis etwa 400pg/ml ansteigen [353]. In der hier vorliegenden Studie war erstmals eine Assoziation zwischen IL-22 und I-FABP zu beobachten (Bingold et al.; unpublizierte Daten). Insbesondere zeigte sich, dass in 100% der Fälle (7/7) Patienten mit höheren Serumkonzentrationen von IL-22 ($\geq 150\text{pg/ml}$) pathologisch erhöhte I-FABP-Konzentrationen ($\geq 200\text{pg/ml}$) aufwiesen. Im Gegensatz dazu zeigten Patienten mit IL-22-Konzentrationen unter 150pg/ml in nur 33% der Fälle (3/9) erhöhte systemische I-FABP-Spiegel. Dieser Unterschied war statistisch signifikant ($p<0,05$; *Fisher's exact test*). Obwohl die analysierte Patientengruppe zu klein war, um eine sichere Aussage zu treffen, implizieren diese Daten einen möglichen Beitrag einer pathologisch erhöhten IL-22-Produktion zur Epithelzellschädigung im Verlauf der Sepsis. Das destruktive Potential von IL-22 wurde kürzlich auch in einer Studie untermauert, die zeigt, dass IL-22 eine Schädigung der *tight junctions* (TJ) in der Blut-Hirn-Schranke bewirken kann [102]. In diesem Zusammenhang ist auch die IL-22-vermittelte IL-8-Expression von Bedeutung. IL-8 spielt bei der Infiltration neutrophiler Zellen in entzündetes Gewebe eine wichtige Rolle und ist mit der Zerstörung der intestinalen Barrierefunktion assoziiert [354]. In der Literatur wird

einer geschädigten intestinalen Barriervedysfunktion eine bedeutende Funktion bei der Pathogenese der Sepsis zugeschrieben [353, 355]. Neben I-FABP ist die epitheliale Expression der iNOS ein weiterer Parameter der intestinalen Barriervedysfunktion [237, 356]. In Kapitel 1.6 ist bereits einleitend darauf hingewiesen worden, dass die iNOS-abhängige NO-Produktion maßgeblich an der Pathogenese der Multiorgandysfunktion beteiligt ist. Verschiedene Arbeiten zeigen eine vermehrte iNOS-Expression bzw. eine erhöhte NO-Zirkulation bei Sepsispatienten [357-362] sowie in unterschiedlichen Nagermodellen der akuten Sepsis [363-366]. In einem Mausmodell des Salmonellen-induzierten septischen Schocks wurden entgegen bisherigen Vermutungen nicht-hämatopoetische Zellen wie beispielsweise intestinale Epithelzellen als Ursprung der massiven NO-Produktion identifiziert [367]. Die Gruppe um Mitchell P. Fink und Russel L. Delude sowie andere Labore zeigen in mehreren Arbeiten eindrucksvoll, dass das entzündliche Milieu eines septischen Schocks markante Veränderungen in Struktur und Funktion von TJ im Epithelium hervorruft. Dabei verursachen proinflammatorische Zytokine über eine Induktion der iNOS-Expression mit nachfolgender NO-Freisetzung eine epitheliale Barriervedysfunktion, womit der Schutz vor einer systemischen Kontamination durch Pathogene und Toxine nicht mehr gewährleistet ist [237]. Es wird deutlich, dass NO oder andere verwandte reaktive Spezies die epitheliale Permeabilität über eine gestörte Expression oder Lokalisation wichtiger Bestandteile der TJ erhöhen. Klinische Studien zeigen eine Zunahme der intestinalen epithelialen Permeabilität in einer Vielzahl akuter Erkrankungen, welche mit einer systemischen Entzündung verbunden sind [368-371]. Darüber hinaus weisen einige aktuelle Studien darauf hin, dass eine verstärkte intestinale Permeabilität in intensivmedizinisch betreuten Patienten mit einem vermehrten Risiko für Komplikationen wie Multiorganversagen oder erhöhter Mortalität assoziiert ist [370-374].

Diese Ergebnisse sowie weitere Studien weisen iNOS/NO eine zentrale Schlüsselfunktion im septischen Schock zu und eröffnen somit ein potentiellies Angriffsziel für zukünftige Therapiemaßnahmen. Dabei ist aber zu bedenken, dass während einer Sepsis NO über verschiedene NO-Synthasen generiert wird (siehe Kapitel 1.5.1) und dementsprechend unterschiedliche Aufgaben besitzt. Im Vergleich zur iNOS vermittelt die eNOS wichtige physiologische Prozesse. Sie spielt beispielsweise bei der Gefäßdilation eine zentrale Rolle. Dadurch erhält sie während einer Sepsis den mikrovaskulären Blutfluss in den Organen aufrecht und erfüllt so essentiell protektive und organerhaltende Funktionen. Bei der Verwendung von NOS-Inhibitoren haben verschiedene Arbeiten in Tiermodellen [375-

377] aber auch klinische Studien [378] sehr deutlich gezeigt, dass nicht-selektive NOS-Inhibitoren ein Organversagen fördern sowie die Mortalität drastisch erhöhen. Die Hemmung der eNOS und das Fehlen ihrer protektiven Funktionen erklären die teils dramatischen Auswirkungen nicht-selektiver NOS-Inhibitoren im septischen Schock. Generell beugen selektive iNOS-Inhibitoren einem Organversagen vor und verbessern auch die Überlebensrate im Tiermodell [363, 377, 379-383]. Zurzeit liegen aber keine Daten über eine Verwendung selektiver iNOS-Inhibitoren bei Sepsispatienten vor.

Unter der Sepsis ist ein komplexes Syndrom zu verstehen, welches sowohl Phasen der Hyperinflammation als auch der Immunparalyse widerspiegelt. Die im ersten Teil dieser Arbeit gezeigten Beobachtungen zur IL-22-induzierten Potenzierung der iNOS-Expression in humanen epithelialen Kolonkarzinomzellen bieten eine mögliche Verknüpfung zur Epithelschädigung im Rahmen einer Sepsis. Hier könnte IL-22 über eine Aktivierung des iNOS/NO-Signalweges einen möglichen Beitrag zur intestinalen Barrieredysfunktion und nachfolgender bakterieller Translokation leisten. Dennoch besitzt IL-22 auch das Potential, die epitheliale Immunabwehr durch Induktion antimikrobieller Peptide zu aktivieren. Möglicherweise existiert hier ein Schwellenwert, welcher, falls überschritten, den primär protektiven Faktor IL-22 in einen pathologischen Parameter überführt. Weiterführende Studien sind hier erforderlich, um die potentiell janusköpfige Rolle von IL-22 bei der intestinalen Homöostase detailliert darzustellen. Zum aktuellen Zeitpunkt ist die Rolle von IL-22 in der Sepsis noch nahezu unbekannt. Daher ist zu klären, wie die IL-22-vermittelte Aktivierung der epithelialen Immunabwehr [110, 111], die systemische Immunsuppression über die Induktion von IL-10 [260] sowie das proinflammatorische [59, 73, 276] und destruktive Potential [85, 102] von IL-22 in Einklang zu bringen sind.

5 Zusammenfassung

IL-22 ist ein T_H17 -Signaturzytokin und wird primär von aktivierten T- und NK-Zellen produziert. Die Literatur beschreibt IL-22 als immunregulatorisches Signalmolekül, welches vor allem bei Infektionen und Entzündungsprozessen eine wichtige Rolle spielt. Typische IL-22-induzierte Gene sind beispielsweise Akut-Phase-Proteine, β -Defensine sowie Matrixmetalloproteasen. In dieser Arbeit wurde erstmals gezeigt, dass IL-22 die IFN γ -induzierte iNOS-Expression in humanen DLD-1 Kolonkarzinomzellen massiv verstärkt. Eine gestörte iNOS-Induktion mit folglich extensiver NO-Produktion trägt zu entzündlichen Veränderungen und zur Tumorentstehung bei. Insbesondere gibt es stichhaltige Belege, welche iNOS und NO in Verbindung mit Krebs als potentes Mutagen, als Angiogenesefaktor, als Verstärker der Protoonkogenexpression und als Inhibitor der Apoptose charakterisieren. Demzufolge ist gerade die Identifikation von Signaltransduktionswegen von Interesse, welche das Potential zur Regulation der iNOS-Expression in epithelialen Kolonkarzinomzellen besitzen. Der Nachweis des IL-22-Rezeptorkomplexes sowie einer STAT3-Phosphorylierung belegte die IL-22-Responsivität der hier verwendeten DLD-1 Kolonkarzinomzellen. Der Transkriptionsfaktor STAT3 gilt als prominentes Signalmolekül in der Signaltransduktionskette von IL-22. In der aktuellen Literatur wird STAT3 aufgrund seiner antiapoptotischen und proliferativen Eigenschaften als Onkogen definiert. Sowohl in Patienten mit *Morbus Crohn* als auch im humanen Kolorektalkarzinom ist eine Überexpression von STAT3 und iNOS beschrieben. Unter Verwendung einer STAT3-spezifischen siRNA konnte der Nachweis erbracht werden, dass STAT3 ein essentieller Faktor in der IL-22-vermittelten Induktion der iNOS-Expression ist. *Luciferase*-Reporterstudien zeigten, dass IL-22 die humane iNOS-Promotoraktivität in DLD-1 Zellen, welche die *Photinus pyralis* (Firefly)-Luciferase unter Kontrolle eines 16kb-iNOS-Promotorkonstrukts überexprimieren (DLD-1/pXP $_2$ -16kb), erhöht. Somit kann eine Regulation der Transkription durch IL-22 angenommen werden. Dennoch vermag diese Arbeit die Frage nach den transkriptionellen Regulationsmechanismen der IL-22-vermittelten iNOS-Expression in DLD-1 Zellen nicht abschließend zu beantworten. Eine Beteiligung ausgewählter Parameter der Zellaktivierung wie beispielsweise NF κ B, STAT1 α oder IRF-1 an der IL-22-vermittelten iNOS-Induktion konnte durch die vorliegende Arbeit ausgeschlossen werden. Neben transkriptionellen Regulationsmechanismen übernimmt auch die Regulation der iNOS mRNA-Stabilität eine wichtige Funktion bei der Induktion der iNOS-Expression.

Allerdings zeigten auch hier die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass IL-22 die iNOS-mRNA nicht stabilisieren kann. Dies bekräftigt wiederum die Annahme, dass IL-22 auf transkriptioneller Ebene den iNOS-Promotor reguliert. Weitere Versuche zeigten auch, dass IL-22 spezifisch an der iNOS-Expression in Kolonkarzinomzellen beteiligt ist und keinen generellen Verstärker der IFN γ -induzierten Genexpression darstellt. Beachtet man hierbei die bedeutende Rolle von STAT3 und iNOS bei Entzündung und Karzinogenese, so repräsentiert IL-22 möglicherweise eine neue Zielstruktur für immuntherapeutische Interventionen im Rahmen dieser Erkrankungen.

Der zweite Abschnitt der vorgelegten Arbeit beschäftigte sich mit der Regulation der IL-22-Sekretion im Kontext von Sepsis und systemischer Entzündung. Es stellte sich die Frage, inwiefern IL-22 in diesem komplexen klinischen Syndrom der Sepsis nachzuweisen ist. In diesem Zusammenhang zeigte sich, dass sowohl eine generelle T-Zellaktivierung sowie verschiedene Stimuli der angeborenen Immunität, hier im Besonderen ein hitze-inaktiviertes Lysat von *Staphylococcus epidermidis*, eine vermehrte IL-22-Produktion anregen. Eine wichtige Frage ist hier die pharmakologische Beeinflussung der IL-22-Sekretion. Da bei der Therapie einer Sepsis die Behandlung mit niedrig dosierten Glukokortikoiden Erfolg versprechend ist, wurde im Folgenden der Einfluss des klassischen antientzündlichen Pharmakons Dexamethason auf die IL-22-Sekretion in PBMC untersucht. Es konnte eindrucksvoll gezeigt werden, dass Dexamethason sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene einen sehr potenten Inhibitor der *S. epidermidis*-induzierten IL-22-Sekretion darstellt. Um die *in vitro*-Daten der IL-22-Sekretion nach Immunaktivierung humaner PBMC durch *in vivo*-Experimente zu ergänzen, wurde ein kürzlich etabliertes Nagermodell der schweren Sepsis mit akutem Verlauf verwendet (CLI; caecum ligation and incision). In diesem Modell ist IL-22 im Vergleich zu unbehandelten Tieren signifikant erhöht. In Übereinstimmung mit den *in vitro*-Experimenten in humanen PBMC hat die Applikation von Dexamethason im CLI-Modell die Hemmung der IL-22-Produktion zur Folge. Zur Abrundung dieser Ergebnisse wurde das Serum von Patienten mit einer Peritonitis-bedingten Sepsis untersucht und es konnte erstmals eindrucksvoll gezeigt werden, dass IL-22 in dieser Patientengruppe signifikant erhöht ist.

Zum aktuellen Zeitpunkt ist die Rolle von IL-22 in der Sepsis noch nahezu unbekannt. Daher ist zu klären, wie die eingehend beschriebene IL-22-vermittelte Aktivierung der epithelialen Immunabwehr, die systemische Immunsuppression über die Induktion von IL-10 sowie das proinflammatorische und destruktive Potential von IL-22 in Einklang zu bringen sind.

6 Literaturverzeichnis

1. Chaplin, D.D., 1. *Overview of the immune response*. J Allergy Clin Immunol, 2003. **111**(2 Suppl): p. S442-59.
2. Medzhitov, R. and C.A. Janeway, Jr., *Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition*. Cell, 1997. **91**(3): p. 295-8.
3. Frank, M.M. and L.F. Fries, *The role of complement in inflammation and phagocytosis*. Immunol Today, 1991. **12**(9): p. 322-6.
4. Yang, D., A. Biragyn, L.W. Kwak, and J.J. Oppenheim, *Mammalian defensins in immunity: more than just microbicidal*. Trends Immunol, 2002. **23**(6): p. 291-6.
5. Brown, M.G., A.O. Dokun, J.W. Heusel, H.R. Smith, D.L. Beckman, E.A. Blattenberger, C.E. Dubbelde, L.R. Stone, A.A. Scalzo, and W.M. Yokoyama, *Vital involvement of a natural killer cell activation receptor in resistance to viral infection*. Science, 2001. **292**(5518): p. 934-7.
6. Panitch, H.S., R.L. Hirsch, J. Schindler, and K.P. Johnson, *Treatment of multiple sclerosis with gamma interferon: exacerbations associated with activation of the immune system*. Neurology, 1987. **37**(7): p. 1097-102.
7. Feldmann, M. and L. Steinman, *Design of effective immunotherapy for human autoimmunity*. Nature, 2005. **435**(7042): p. 612-9.
8. Coffman, R.L. and J. Carty, *A T cell activity that enhances polyclonal IgE production and its inhibition by interferon-gamma*. J Immunol, 1986. **136**(3): p. 949-54.
9. Mosmann, T.R., H. Cherwinski, M.W. Bond, M.A. Giedlin, and R.L. Coffman, *Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins*. J Immunol, 1986. **136**(7): p. 2348-57.
10. Alam, R. and M. Gorska, 3. *Lymphocytes*. J Allergy Clin Immunol, 2003. **111**(2 Suppl): p. S476-85.
11. Park, H., Z. Li, X.O. Yang, S.H. Chang, R. Nurieva, Y.H. Wang, Y. Wang, L. Hood, Z. Zhu, Q. Tian, and C. Dong, *A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17*. Nat Immunol, 2005. **6**(11): p. 1133-41.
12. Harrington, L.E., R.D. Hatton, P.R. Mangan, H. Turner, T.L. Murphy, K.M. Murphy, and C.T. Weaver, *Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages*. Nat Immunol, 2005. **6**(11): p. 1123-32.

13. Langrish, C.L., Y. Chen, W.M. Blumenschein, J. Mattson, B. Basham, J.D. Sedgwick, T. McClanahan, R.A. Kastelein, and D.J. Cua, *IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation*. J Exp Med, 2005. **201**(2): p. 233-40.
14. Aggarwal, S., N. Ghilardi, M.H. Xie, F.J. de Sauvage, and A.L. Gurney, *Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17*. J Biol Chem, 2003. **278**(3): p. 1910-4.
15. Korn, T., E. Bettelli, W. Gao, A. Awasthi, A. Jager, T.B. Strom, M. Oukka, and V.K. Kuchroo, *IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells*. Nature, 2007. **448**(7152): p. 484-7.
16. Nurieva, R., X.O. Yang, G. Martinez, Y. Zhang, A.D. Panopoulos, L. Ma, K. Schluns, Q. Tian, S.S. Watowich, A.M. Jetten, and C. Dong, *Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells*. Nature, 2007. **448**(7152): p. 480-3.
17. Liang, S.C., X.Y. Tan, D.P. Luxenberg, R. Karim, K. Dunussi-Joannopoulos, M. Collins, and L.A. Fouser, *Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides*. J Exp Med, 2006. **203**(10): p. 2271-9.
18. Wilson, N.J., K. Boniface, J.R. Chan, B.S. McKenzie, W.M. Blumenschein, J.D. Mattson, B. Basham, K. Smith, T. Chen, F. Morel, J.C. Lecron, R.A. Kastelein, D.J. Cua, T.K. McClanahan, E.P. Bowman, and R. de Waal Malefyt, *Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells*. Nat Immunol, 2007. **8**(9): p. 950-7.
19. Stockinger, B. and M. Veldhoen, *Differentiation and function of Th17 T cells*. Curr Opin Immunol, 2007. **19**(3): p. 281-6.
20. Annunziato, F., L. Cosmi, V. Santarlasci, L. Maggi, F. Liotta, B. Mazzinghi, E. Parente, L. Fili, S. Ferri, F. Frosali, F. Giudici, P. Romagnani, P. Parronchi, F. Tonelli, E. Maggi, and S. Romagnani, *Phenotypic and functional features of human Th17 cells*. J Exp Med, 2007. **204**(8): p. 1849-61.
21. Veldhoen, M., R.J. Hocking, C.J. Atkins, R.M. Locksley, and B. Stockinger, *TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells*. Immunity, 2006. **24**(2): p. 179-89.

22. Bettelli, E., Y. Carrier, W. Gao, T. Korn, T.B. Strom, M. Oukka, H.L. Weiner, and V.K. Kuchroo, *Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells*. Nature, 2006. **441**(7090): p. 235-8.
23. Mangan, P.R., L.E. Harrington, D.B. O'Quinn, W.S. Helms, D.C. Bullard, C.O. Elson, R.D. Hatton, S.M. Wahl, T.R. Schoeb, and C.T. Weaver, *Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage*. Nature, 2006. **441**(7090): p. 231-4.
24. Li, M.O., Y.Y. Wan, and R.A. Flavell, *T cell-produced transforming growth factor-beta1 controls T cell tolerance and regulates Th1- and Th17-cell differentiation*. Immunity, 2007. **26**(5): p. 579-91.
25. Acosta-Rodriguez, E.V., G. Napolitani, A. Lanzavecchia, and F. Sallusto, *Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells*. Nat Immunol, 2007. **8**(9): p. 942-9.
26. Yang, X.O., A.D. Panopoulos, R. Nurieva, S.H. Chang, D. Wang, S.S. Watowich, and C. Dong, *STAT3 regulates cytokine-mediated generation of inflammatory helper T cells*. J Biol Chem, 2007. **282**(13): p. 9358-63.
27. Mathur, A.N., H.C. Chang, D.G. Zisoulis, G.L. Stritesky, Q. Yu, J.T. O'Malley, R. Kapur, D.E. Levy, G.S. Kansas, and M.H. Kaplan, *Stat3 and Stat4 direct development of IL-17-secreting Th cells*. J Immunol, 2007. **178**(8): p. 4901-7.
28. Brüstle, A., S. Heink, M. Huber, C. Rosenplanter, C. Stadelmann, P. Yu, E. Arpaia, T.W. Mak, T. Kamradt, and M. Lohoff, *The development of inflammatory T(H)-17 cells requires interferon-regulatory factor 4*. Nat Immunol, 2007. **8**(9): p. 958-66.
29. Ivanov, Il, B.S. McKenzie, L. Zhou, C.E. Tadokoro, A. Lepelley, J.J. Lafaille, D.J. Cua, and D.R. Littman, *The orphan nuclear receptor RORgammat directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells*. Cell, 2006. **126**(6): p. 1121-33.
30. Batten, M., J. Li, S. Yi, N.M. Kijavini, D.M. Danilenko, S. Lucas, J. Lee, F.J. de Sauvage, and N. Ghilardi, *Interleukin 27 limits autoimmune encephalomyelitis by suppressing the development of interleukin 17-producing T cells*. Nat Immunol, 2006. **7**(9): p. 929-36.
31. Stumhofer, J.S., A. Laurence, E.H. Wilson, E. Huang, C.M. Tato, L.M. Johnson, A.V. Villarino, Q. Huang, A. Yoshimura, D. Sehy, C.J. Saris, J.J. O'Shea, L. Hennighausen, M. Ernst, and C.A. Hunter, *Interleukin 27 negatively regulates the*

- development of interleukin 17-producing T helper cells during chronic inflammation of the central nervous system.* Nat Immunol, 2006. **7**(9): p. 937-45.
32. Yang, J., M. Yang, T.M. Htut, X. Ouyang, A. Hanidu, X. Li, R. Sellati, H. Jiang, S. Zhang, H. Li, J. Zhao, A.T. Ting, L. Mayer, J.C. Unkeless, M.E. Labadia, M. Hodge, J. Li, and H. Xiong, *Epstein-Barr virus-induced gene 3 negatively regulates IL-17, IL-22 and RORgammat.* Eur J Immunol, 2008. **38**(5): p. 1204-14.
33. Laurence, A. and J.J. O'Shea, *T(H)-17 differentiation: of mice and men.* Nat Immunol, 2007. **8**(9): p. 903-5.
34. Dumoutier, L., J. Louahed, and J.C. Renauld, *Cloning and characterization of IL-10-related T cell-derived inducible factor (IL-TIF), a novel cytokine structurally related to IL-10 and inducible by IL-9.* J Immunol, 2000a. **164**(4): p. 1814-9.
35. Dumoutier, L., E. Van Roost, D. Colau, and J.C. Renauld, *Human interleukin-10-related T cell-derived inducible factor: molecular cloning and functional characterization as an hepatocyte-stimulating factor.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2000b. **97**(18): p. 10144-9.
36. Xie, M.H., S. Aggarwal, W.H. Ho, J. Foster, Z. Zhang, J. Stinson, W.I. Wood, A.D. Goddard, and A.L. Gurney, *Interleukin (IL)-22, a novel human cytokine that signals through the interferon receptor-related proteins CRF2-4 and IL-22R.* J Biol Chem, 2000. **275**(40): p. 31335-9.
37. Blumberg, H., D. Conklin, W.F. Xu, A. Grossmann, T. Brender, S. Carollo, M. Eagan, D. Foster, B.A. Haldeman, A. Hammond, H. Haugen, L. Jelinek, J.D. Kelly, K. Madden, M.F. Maurer, J. Parrish-Novak, D. Prunkard, S. Sexson, C. Sprecher, K. Waggle, J. West, T.E. Whitmore, L. Yao, M.K. Kuechle, B.A. Dale, and Y.A. Chandrasekher, *Interleukin 20: discovery, receptor identification, and role in epidermal function.* Cell, 2001. **104**(1): p. 9-19.
38. Gallagher, G., H. Dickensheets, J. Eskdale, L.S. Izotova, O.V. Mirochnitchenko, J.D. Peat, N. Vazquez, S. Pestka, R.P. Donnelly, and S.V. Kotenko, *Cloning, expression and initial characterization of interleukin-19 (IL-19), a novel homologue of human interleukin-10 (IL-10).* Genes Immun, 2000. **1**(7): p. 442-50.
39. Knappe, A., S. Hor, S. Wittmann, and H. Fickenscher, *Induction of a novel cellular homolog of interleukin-10, AK155, by transformation of T lymphocytes with herpesvirus saimiri.* J Virol, 2000. **74**(8): p. 3881-7.
40. Jiang, H., J.J. Lin, Z.Z. Su, N.I. Goldstein, and P.B. Fisher, *Subtraction hybridization identifies a novel melanoma differentiation associated gene, mda-7, modulated*

- during human melanoma differentiation, growth and progression. *Oncogene*, 1995. **11**(12): p. 2477-86.
41. Volk, H., K. Asadullah, G. Gallagher, R. Sabat, and G. Grutz, *IL-10 and its homologs: important immune mediators and emerging immunotherapeutic targets*. *Trends Immunol*, 2001. **22**(8): p. 414-7.
42. Kotenko, S.V., G. Gallagher, V.V. Baurin, A. Lewis-Antes, M. Shen, N.K. Shah, J.A. Langer, F. Sheikh, H. Dickensheets, and R.P. Donnelly, *IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex*. *Nat Immunol*, 2003. **4**(1): p. 69-77.
43. Sheppard, P., W. Kindsvogel, W. Xu, K. Henderson, S. Schlutsmeyer, T.E. Whitmore, R. Kuestner, U. Garrigues, C. Birks, J. Roraback, C. Ostrander, D. Dong, J. Shin, S. Presnell, B. Fox, B. Haldeman, E. Cooper, D. Taft, T. Gilbert, F.J. Grant, M. Tackett, W. Krivan, G. McKnight, C. Clegg, D. Foster, and K.M. Klucher, *IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R*. *Nat Immunol*, 2003. **4**(1): p. 63-8.
44. Donnelly, R.P., F. Sheikh, S.V. Kotenko, and H. Dickensheets, *The expanded family of class II cytokines that share the IL-10 receptor-2 (IL-10R2) chain*. *J Leukoc Biol*, 2004. **76**(2): p. 314-21.
45. Langer, J.A., E.C. Cutrone, and S. Kotenko, *The Class II cytokine receptor (CRF2) family: overview and patterns of receptor-ligand interactions*. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2004. **15**(1): p. 33-48.
46. Pestka, S., C.D. Krause, D. Sarkar, M.R. Walter, Y. Shi, and P.B. Fisher, *Interleukin-10 and related cytokines and receptors*. *Annu Rev Immunol*, 2004. **22**: p. 929-79.
47. Wolk, K., S. Kunz, K. Asadullah, and R. Sabat, *Cutting edge: immune cells as sources and targets of the IL-10 family members?* *J Immunol*, 2002. **168**(11): p. 5397-402.
48. Wolk, K., E. Witte, E. Wallace, W.D. Docke, S. Kunz, K. Asadullah, H.D. Volk, W. Sterry, and R. Sabat, *IL-22 regulates the expression of genes responsible for antimicrobial defense, cellular differentiation, and mobility in keratinocytes: a potential role in psoriasis*. *Eur J Immunol*, 2006a. **36**(5): p. 1309-23.
49. Wolk, K., S. Kunz, E. Witte, M. Friedrich, K. Asadullah, and R. Sabat, *IL-22 increases the innate immunity of tissues*. *Immunity*, 2004. **21**(2): p. 241-54.
50. Wolk, K., K. Witte, E. Witte, S. Proesch, G. Schulze-Tanzil, K. Nasilowska, J. Thilo, K. Asadullah, W. Sterry, H.D. Volk, and R. Sabat, *Maturing dendritic cells are an*

- important source of IL-29 and IL-20 that may cooperatively increase the innate immunity of keratinocytes.* J Leukoc Biol, 2008. **83**(5): p. 1181-93.
51. Chen, Z., C.M. Tato, L. Muul, A. Laurence, and J.J. O'Shea, *Distinct regulation of interleukin-17 in human T helper lymphocytes.* Arthritis Rheum, 2007. **56**(9): p. 2936-46.
 52. Kotenko, S.V., L.S. Izotova, O.V. Mirochnitchenko, E. Esterova, H. Dickensheets, R.P. Donnelly, and S. Pestka, *Identification of the functional interleukin-22 (IL-22) receptor complex: the IL-10R2 chain (IL-10Rbeta) is a common chain of both the IL-10 and IL-22 (IL-10-related T cell-derived inducible factor, IL-TIF) receptor complexes.* J Biol Chem, 2001a. **276**(4): p. 2725-32.
 53. Logsdon, N.J., B.C. Jones, K. Josephson, J. Cook, and M.R. Walter, *Comparison of interleukin-22 and interleukin-10 soluble receptor complexes.* J Interferon Cytokine Res, 2002. **22**(11): p. 1099-112.
 54. Logsdon, N.J., B.C. Jones, J.C. Allman, L. Izotova, B. Schwartz, S. Pestka, and M.R. Walter, *The IL-10R2 binding hot spot on IL-22 is located on the N-terminal helix and is dependent on N-linked glycosylation.* J Mol Biol, 2004. **342**(2): p. 503-14.
 55. Li, J., K.N. Tomkinson, X.Y. Tan, P. Wu, G. Yan, V. Spaulding, B. Deng, B. Annis-Freeman, K. Heveron, R. Zollner, G. De Zutter, J.F. Wright, T.K. Crawford, W. Liu, K.A. Jacobs, N.M. Wolfman, V. Ling, D.D. Pittman, G.M. Veldman, and L.A. Fouser, *Temporal associations between interleukin 22 and the extracellular domains of IL-22R and IL-10R2.* Int Immunopharmacol, 2004. **4**(5): p. 693-708.
 56. Wolk, K., E. Witte, U. Reineke, K. Witte, M. Friedrich, W. Sterry, K. Asadullah, H.D. Volk, and R. Sabat, *Is there an interaction between interleukin-10 and interleukin-22?* Genes Immun, 2005. **6**(1): p. 8-18.
 57. Wolk, K. and R. Sabat, *Interleukin-22: a novel T- and NK-cell derived cytokine that regulates the biology of tissue cells.* Cytokine Growth Factor Rev, 2006b. **17**(5): p. 367-80.
 58. Gurney, A.L., *IL-22, a Th1 cytokine that targets the pancreas and select other peripheral tissues.* Int Immunopharmacol, 2004. **4**(5): p. 669-77.
 59. Andoh, A., Z. Zhang, O. Inatomi, S. Fujino, Y. Deguchi, Y. Araki, T. Tsujikawa, K. Kitoh, S. Kim-Mitsuyama, A. Takayanagi, N. Shimizu, and Y. Fujiyama, *Interleukin-22, a member of the IL-10 subfamily, induces inflammatory responses in colonic subepithelial myofibroblasts.* Gastroenterology, 2005. **129**(3): p. 969-84.

60. Ikeuchi, H., T. Kuroiwa, N. Hiramatsu, Y. Kaneko, K. Hiromura, K. Ueki, and Y. Nojima, *Expression of interleukin-22 in rheumatoid arthritis: potential role as a proinflammatory cytokine*. Arthritis Rheum, 2005. **52**(4): p. 1037-46.
61. Dumoutier, L., D. Lejeune, D. Colau, and J.C. Renauld, *Cloning and characterization of IL-22 binding protein, a natural antagonist of IL-10-related T cell-derived inducible factor/IL-22*. J Immunol, 2001. **166**(12): p. 7090-5.
62. Kotenko, S.V., L.S. Izotova, O.V. Mirochnitchenko, E. Esterova, H. Dickensheets, R.P. Donnelly, and S. Pestka, *Identification, cloning, and characterization of a novel soluble receptor that binds IL-22 and neutralizes its activity*. J Immunol, 2001b. **166**(12): p. 7096-103.
63. Xu, W., S.R. Presnell, J. Parrish-Novak, W. Kindsvogel, S. Jaspers, Z. Chen, S.R. Dillon, Z. Gao, T. Gilbert, K. Madden, S. Schlutsmeyer, L. Yao, T.E. Whitmore, Y. Chandrasekhar, F.J. Grant, M. Maurer, L. Jelinek, H. Storey, T. Brender, A. Hammond, S. Topouzis, C.H. Clegg, and D.C. Foster, *A soluble class II cytokine receptor, IL-22RA2, is a naturally occurring IL-22 antagonist*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(17): p. 9511-6.
64. Aggarwal, S., M.H. Xie, M. Maruoka, J. Foster, and A.L. Gurney, *Acinar cells of the pancreas are a target of interleukin-22*. J Interferon Cytokine Res, 2001. **21**(12): p. 1047-53.
65. Lejeune, D., L. Dumoutier, S. Constantinescu, W. Kruijer, J.J. Schuringa, and J.C. Renauld, *Interleukin-22 (IL-22) activates the JAK/STAT, ERK, JNK, and p38 MAP kinase pathways in a rat hepatoma cell line. Pathways that are shared with and distinct from IL-10*. J Biol Chem, 2002. **277**(37): p. 33676-82.
66. Nagalakshmi, M.L., A. Rascole, S. Zurawski, S. Menon, and R. de Waal Malefyt, *Interleukin-22 activates STAT3 and induces IL-10 by colon epithelial cells*. Int Immunopharmacol, 2004. **4**(5): p. 679-91.
67. Whittington, H.A., L. Armstrong, K.M. Uppington, and A.B. Millar, *Interleukin-22: a potential immunomodulatory molecule in the lung*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2004. **31**(2): p. 220-6.
68. Brand, S., J. Dambacher, F. Beigel, K. Zitzmann, M.H. Heeg, T.S. Weiss, T. Pruger, T. Olszak, C.J. Steib, M. Storr, B. Goke, H. Diepolder, M. Bilzer, W.E. Thasler, and C.J. Auernhammer, *IL-22-mediated liver cell regeneration is abrogated by SOCS-1/3 overexpression in vitro*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2007. **292**(4): p. G1019-28.

69. Kotenko, S.V., C.D. Krause, L.S. Izotova, B.P. Pollack, W. Wu, and S. Pestka, *Identification and functional characterization of a second chain of the interleukin-10 receptor complex*. EMBO J, 1997. **16**(19): p. 5894-903.
70. Boniface, K., F.X. Bernard, M. Garcia, A.L. Gurney, J.C. Lecron, and F. Morel, *IL-22 inhibits epidermal differentiation and induces proinflammatory gene expression and migration of human keratinocytes*. J Immunol, 2005. **174**(6): p. 3695-702.
71. Schröder, J.M. and J. Harder, *Antimicrobial skin peptides and proteins*. Cell Mol Life Sci, 2006. **63**(4): p. 469-86.
72. Gläser, R., J. Harder, H. Lange, J. Bartels, E. Christophers, and J.M. Schröder, *Antimicrobial psoriasin (S100A7) protects human skin from Escherichia coli infection*. Nat Immunol, 2005. **6**(1): p. 57-64.
73. Brand, S., F. Beigel, T. Olszak, K. Zitzmann, S.T. Eichhorst, J.M. Otte, H. Diepolder, A. Marquardt, W. Jagla, A. Popp, S. Leclair, K. Herrmann, J. Seiderer, T. Ochsenkühn, B. Göke, C.J. Auernhammer, and J. Dambacher, *IL-22 is increased in active Crohn's disease and promotes proinflammatory gene expression and intestinal epithelial cell migration*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2006. **290**(4): p. G827-38.
74. Hubner, G., M. Brauchle, M. Gregor, and S. Werner, *Activin A: a novel player and inflammatory marker in inflammatory bowel disease?* Lab Invest, 1997. **77**(4): p. 311-8.
75. Grosfeld, J.L., X. Du, and D.A. Williams, *Interleukin-11: its biology and prospects for clinical use*. JPEN J Parenter Enteral Nutr, 1999. **23**(5 Suppl): p. S67-9.
76. Fitch, E., E. Harper, I. Skorcheva, S.E. Kurtz, and A. Blauvelt, *Pathophysiology of psoriasis: recent advances on IL-23 and Th17 cytokines*. Curr Rheumatol Rep, 2007. **9**(6): p. 461-7.
77. Lowes, M.A., T. Kikuchi, J. Fuentes-Duculan, I. Cardinale, L.C. Zaba, A.S. Haider, E.P. Bowman, and J.G. Krueger, *Psoriasis vulgaris lesions contain discrete populations of Th1 and Th17 T cells*. J Invest Dermatol, 2008. **128**(5): p. 1207-11.
78. Boniface, K., E. Guignouard, N. Pedretti, M. Garcia, A. Delwail, F.X. Bernard, F. Nau, G. Guillet, G. Dagregorio, H. Yssel, J.C. Lecron, and F. Morel, *A role for T cell-derived interleukin 22 in psoriatic skin inflammation*. Clin Exp Immunol, 2007. **150**(3): p. 407-15.
79. Haider, A.S., M.A. Lowes, M. Suarez-Farinas, L.C. Zaba, I. Cardinale, A. Khatcherian, I. Novitskaya, K.M. Wittkowski, and J.G. Krueger, *Identification of*

- cellular pathways of "type 1," Th17 T cells, and TNF- and inducible nitric oxide synthase-producing dendritic cells in autoimmune inflammation through pharmacogenomic study of cyclosporine A in psoriasis. *J Immunol*, 2008. **180**(3): p. 1913-20.
80. Zaba, L.C., I. Cardinale, P. Gilleaudeau, M. Sullivan-Whalen, M. Suarez Farinas, J. Fuentes-Duculan, I. Novitskaya, A. Khatcherian, M.J. Bluth, M.A. Lowes, and J.G. Krueger, *Amelioration of epidermal hyperplasia by TNF inhibition is associated with reduced Th17 responses*. *J Exp Med*, 2007. **204**(13): p. 3183-94.
 81. Lee, E., W.L. Trepicchio, J.L. Oestreicher, D. Pittman, F. Wang, F. Chamian, M. Dhodapkar, and J.G. Krueger, *Increased expression of interleukin 23 p19 and p40 in lesional skin of patients with psoriasis vulgaris*. *J Exp Med*, 2004. **199**(1): p. 125-30.
 82. Kauffman, C.L., N. Aria, E. Toichi, T.S. McCormick, K.D. Cooper, A.B. Gottlieb, D.E. Everitt, B. Frederick, Y. Zhu, M.A. Graham, C.E. Pendley, and M.A. Mascelli, *A phase I study evaluating the safety, pharmacokinetics, and clinical response of a human IL-12 p40 antibody in subjects with plaque psoriasis*. *J Invest Dermatol*, 2004. **123**(6): p. 1037-44.
 83. Kastelein, R.A., C.A. Hunter, and D.J. Cua, *Discovery and biology of IL-23 and IL-27: related but functionally distinct regulators of inflammation*. *Annu Rev Immunol*, 2007. **25**: p. 221-42.
 84. Zheng, Y., D.M. Danilenko, P. Valdez, I. Kasman, J. Eastham-Anderson, J. Wu, and W. Ouyang, *Interleukin-22, a T(H)17 cytokine, mediates IL-23-induced dermal inflammation and acanthosis*. *Nature*, 2007. **445**(7128): p. 648-51.
 85. Ma, H.L., S. Liang, J. Li, L. Napierata, T. Brown, S. Benoit, M. Senices, D. Gill, K. Dunussi-Joannopoulos, M. Collins, C. Nickerson-Nutter, L.A. Fouser, and D.A. Young, *IL-22 is required for Th17 cell-mediated pathology in a mouse model of psoriasis-like skin inflammation*. *J Clin Invest*, 2008. **118**(2): p. 597-607.
 86. Cobrin, G.M. and M.T. Abreu, *Defects in mucosal immunity leading to Crohn's disease*. *Immunol Rev*, 2005. **206**: p. 277-95.
 87. Fuss, I.J., C. Becker, Z. Yang, C. Groden, R.L. Hornung, F. Heller, M.F. Neurath, W. Strober, and P.J. Mannon, *Both IL-12p70 and IL-23 are synthesized during active Crohn's disease and are down-regulated by treatment with anti-IL-12 p40 monoclonal antibody*. *Inflamm Bowel Dis*, 2006. **12**(1): p. 9-15.

88. Shih, D.Q. and S.R. Targan, *Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease*. World J Gastroenterol, 2008. **14**(3): p. 390-400.
89. Sugimoto, K., A. Ogawa, E. Mizoguchi, Y. Shimomura, A. Andoh, A.K. Bhan, R.S. Blumberg, R.J. Xavier, and A. Mizoguchi, *IL-22 ameliorates intestinal inflammation in a mouse model of ulcerative colitis*. J Clin Invest, 2008. **118**(2): p. 534-44.
90. Wolk, K., E. Witte, U. Hoffmann, W.D. Doecke, S. Endesfelder, K. Asadullah, W. Sterry, H.D. Volk, B.M. Wittig, and R. Sabat, *IL-22 induces lipopolysaccharide-binding protein in hepatocytes: a potential systemic role of IL-22 in Crohn's disease*. J Immunol, 2007. **178**(9): p. 5973-81.
91. Schmechel, S., A. Konrad, J. Diegelmann, J. Glas, M. Wetzke, E. Paschos, P. Lohse, B. Göke, and S. Brand, *Linking genetic susceptibility to Crohn's disease with Th17 cell function: IL-22 serum levels are increased in Crohn's disease and correlate with disease activity and IL23R genotype status*. Inflamm Bowel Dis, 2008. **14**(2): p. 204-12.
92. te Velde, A.A., F. de Kort, E. Sterrenburg, I. Pronk, F.J. ten Kate, D.W. Hommes, and S.J. van Deventer, *Comparative analysis of colonic gene expression of three experimental colitis models mimicking inflammatory bowel disease*. Inflamm Bowel Dis, 2007. **13**(3): p. 325-30.
93. Elson, C.O., Y. Cong, C.T. Weaver, T.R. Schoeb, T.K. McClanahan, R.B. Fick, and R.A. Kastelein, *Monoclonal anti-interleukin 23 reverses active colitis in a T cell-mediated model in mice*. Gastroenterology, 2007. **132**(7): p. 2359-70.
94. Flanagan, K., Z. Modrusan, J. Cornelius, A. Chavali, I. Kasman, L. Komuves, L. Mo, and L. Diehl, *Intestinal epithelial cell up-regulation of LY6 molecules during colitis results in enhanced chemokine secretion*. J Immunol, 2008. **180**(6): p. 3874-81.
95. Sunderkötter, C., T. Nikolic, M.J. Dillon, N. Van Rooijen, M. Stehling, D.A. Drevets, and P.J. Leenen, *Subpopulations of mouse blood monocytes differ in maturation stage and inflammatory response*. J Immunol, 2004. **172**(7): p. 4410-7.
96. Henderson, S.C., M.M. Kamdar, and A. Bamezai, *Ly-6A.2 expression regulates antigen-specific CD4+ T cell proliferation and cytokine production*. J Immunol, 2002. **168**(1): p. 118-26.
97. Zhang, Z.X., W.L. Stanford, and L. Zhang, *Ly-6A is critical for the function of double negative regulatory T cells*. Eur J Immunol, 2002. **32**(6): p. 1584-92.

98. Jaakkola, I., M. Merinen, S. Jalkanen, and A. Hanninen, *Ly6C induces clustering of LFA-1 (CD11a/CD18) and is involved in subtype-specific adhesion of CD8 T cells*. J Immunol, 2003. **170**(3): p. 1283-90.
99. Pastor Rojo, O., A. Lopez San Roman, E. Albeniz Arbizu, A. de la Hera Martinez, E. Ripoll Sevillano, and A. Albillos Martinez, *Serum lipopolysaccharide-binding protein in endotoxemic patients with inflammatory bowel disease*. Inflamm Bowel Dis, 2007. **13**(3): p. 269-77.
100. Choy, E.H. and G.S. Panayi, *Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis*. N Engl J Med, 2001. **344**(12): p. 907-16.
101. Nistala, K., H. Moncrieffe, K.R. Newton, H. Varsani, P. Hunter, and L.R. Wedderburn, *Interleukin-17-producing T cells are enriched in the joints of children with arthritis, but have a reciprocal relationship to regulatory T cell numbers*. Arthritis Rheum, 2008. **58**(3): p. 875-87.
102. Kebir, H., K. Kreymborg, I. Ifergan, A. Dodelet-Devillers, R. Cayrol, M. Bernard, F. Giuliani, N. Arbour, B. Becher, and A. Prat, *Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation*. Nat Med, 2007. **13**(10): p. 1173-5.
103. Kreymborg, K., R. Etzensperger, L. Dumoutier, S. Haak, A. Rebollo, T. Buch, F.L. Heppner, J.C. Renauld, and B. Becher, *IL-22 is expressed by Th17 cells in an IL-23-dependent fashion, but not required for the development of autoimmune encephalomyelitis*. J Immunol, 2007. **179**(12): p. 8098-104.
104. Radaeva, S., R. Sun, H.N. Pan, F. Hong, and B. Gao, *Interleukin 22 (IL-22) plays a protective role in T cell-mediated murine hepatitis: IL-22 is a survival factor for hepatocytes via STAT3 activation*. Hepatology, 2004. **39**(5): p. 1332-42.
105. Pan, H., F. Hong, S. Radaeva, and B. Gao, *Hydrodynamic gene delivery of interleukin-22 protects the mouse liver from concanavalin A-, carbon tetrachloride-, and Fas ligand-induced injury via activation of STAT3*. Cell Mol Immunol, 2004. **1**(1): p. 43-9.
106. Zenewicz, L.A., G.D. Yancopoulos, D.M. Valenzuela, A.J. Murphy, M. Karow, and R.A. Flavell, *Interleukin-22 but not interleukin-17 provides protection to hepatocytes during acute liver inflammation*. Immunity, 2007. **27**(4): p. 647-59.
107. Missé, D., H. Yssel, D. Trabattoni, C. Oblet, S. Lo Caputo, F. Mazzotta, J. Pène, J.P. Gonzalez, M. Clerici, and F. Veas, *IL-22 participates in an innate anti-HIV-1*

- host-resistance network through acute-phase protein induction*. J Immunol, 2007. **178**(1): p. 407-15.
108. Samson, M., F. Libert, B.J. Doranz, J. Rucker, C. Liesnard, C.M. Farber, S. Saragosti, C. Lapoumeroulie, J. Cognaux, C. Forceille, G. Muyldermans, C. Verhofstede, G. Burtonboy, M. Georges, T. Imai, S. Rana, Y. Yi, R.J. Smyth, R.G. Collman, R.W. Doms, G. Vassart, and M. Parmentier, *Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene*. Nature, 1996. **382**(6593): p. 722-5.
 109. Levillayer, F., M. Mas, F. Levi-Acobas, M. Brahic, and J.F. Bureau, *Interleukin 22 is a candidate gene for Tmevp3, a locus controlling Theiler's virus-induced neurological diseases*. Genetics, 2007. **176**(3): p. 1835-44.
 110. Aujla, S.J., Y.R. Chan, M. Zheng, M. Fei, D.J. Askew, D.A. Pociask, T.A. Reinhart, F. McAllister, J. Edeal, K. Gaus, S. Husain, J.L. Kreindler, P.J. Dubin, J.M. Pilewski, M.M. Myerburg, C.A. Mason, Y. Iwakura, and J.K. Kolls, *IL-22 mediates mucosal host defense against Gram-negative bacterial pneumonia*. Nat Med, 2008. **14**(3): p. 275-81.
 111. Zheng, Y., P.A. Valdez, D.M. Danilenko, Y. Hu, S.M. Sa, Q. Gong, A.R. Abbas, Z. Modrusan, N. Ghilardi, F.J. de Sauvage, and W. Ouyang, *Interleukin-22 mediates early host defense against attaching and effacing bacterial pathogens*. Nat Med, 2008. **14**(3): p. 282-9.
 112. Ignarro, L.J., G.M. Buga, K.S. Wood, R.E. Byrns, and G. Chaudhuri, *Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(24): p. 9265-9.
 113. Palmer, R.M., A.G. Ferrige, and S. Moncada, *Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor*. Nature, 1987. **327**(6122): p. 524-6.
 114. Hofseth, L.J., S.P. Hussain, G.N. Wogan, and C.C. Harris, *Nitric oxide in cancer and chemoprevention*. Free Radic Biol Med, 2003. **34**(8): p. 955-68.
 115. Ambs, S., S.P. Hussain, and C.C. Harris, *Interactive effects of nitric oxide and the p53 tumor suppressor gene in carcinogenesis and tumor progression*. FASEB J, 1997. **11**(6): p. 443-8.
 116. Moncada, S., R.M. Palmer, and E.A. Higgs, *Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology*. Pharmacol Rev, 1991. **43**(2): p. 109-42.

117. Nathan, C. and Q.W. Xie, *Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls*. Cell, 1994. **78**(6): p. 915-8.
118. Tamir, S. and S.R. Tannenbaum, *The role of nitric oxide (NO.) in the carcinogenic process*. Biochim Biophys Acta, 1996. **1288**(2): p. F31-6.
119. Knowles, R.G. and S. Moncada, *Nitric oxide synthases in mammals*. Biochem J, 1994. **298 (Pt 2)**: p. 249-58.
120. Stuehr, D.J., N.S. Kwon, C.F. Nathan, O.W. Griffith, P.L. Feldman, and J. Wiseman, *N omega-hydroxy-L-arginine is an intermediate in the biosynthesis of nitric oxide from L-arginine*. J Biol Chem, 1991a. **266**(10): p. 6259-63.
121. Beckman, J.S., T.W. Beckman, J. Chen, P.A. Marshall, and B.A. Freeman, *Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(4): p. 1620-4.
122. MacMicking, J., Q.W. Xie, and C. Nathan, *Nitric oxide and macrophage function*. Annu Rev Immunol, 1997. **15**: p. 323-50.
123. Charles, I.G., R.M. Palmer, M.S. Hickery, M.T. Bayliss, A.P. Chubb, V.S. Hall, D.W. Moss, and S. Moncada, *Cloning, characterization, and expression of a cDNA encoding an inducible nitric oxide synthase from the human chondrocyte*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(23): p. 11419-23.
124. Curran, R.D., T.R. Billiar, D.J. Stuehr, J.B. Ochoa, B.G. Harbrecht, S.G. Flint, and R.L. Simmons, *Multiple cytokines are required to induce hepatocyte nitric oxide production and inhibit total protein synthesis*. Ann Surg, 1990. **212**(4): p. 462-9; discussion 470-1.
125. Geller, D.A., C.J. Lowenstein, R.A. Shapiro, A.K. Nussler, M. Di Silvio, S.C. Wang, D.K. Nakayama, R.L. Simmons, S.H. Snyder, and T.R. Billiar, *Molecular cloning and expression of inducible nitric oxide synthase from human hepatocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(8): p. 3491-5.
126. Pfeilschifter, J. and H. Schwarzenbach, *Interleukin 1 and tumor necrosis factor stimulate cGMP formation in rat renal mesangial cells*. FEBS Lett, 1990. **273**(1-2): p. 185-7.
127. Eberhardt, W., C. Pluss, R. Hummel, and J. Pfeilschifter, *Molecular mechanisms of inducible nitric oxide synthase gene expression by IL-1beta and cAMP in rat mesangial cells*. J Immunol, 1998. **160**(10): p. 4961-9.

128. Sethi, S. and M. Dikshit, *Modulation of polymorphonuclear leukocytes function by nitric oxide*. Thromb Res, 2000. **100**(3): p. 223-47.
129. Asano, K., C.B. Chee, B. Gaston, C.M. Lilly, C. Gerard, J.M. Drazen, and J.S. Stamler, *Constitutive and inducible nitric oxide synthase gene expression, regulation, and activity in human lung epithelial cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(21): p. 10089-93.
130. Perner, A., L. Andresen, M. Normark, and J. Rask-Madsen, *Constitutive expression of inducible nitric oxide synthase in the normal human colonic epithelium*. Scand J Gastroenterol, 2002. **37**(8): p. 944-8.
131. Kleinert, H., A. Pautz, K. Linker, and P.M. Schwarz, *Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase*. Eur J Pharmacol, 2004. **500**(1-3): p. 255-66.
132. Mühl, H. and J. Pfeilschifter, *Endothelial nitric oxide synthase: a determinant of TNFalpha production by human monocytes/macrophages*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **310**(3): p. 677-80.
133. Weinberg, J.B., M.A. Misukonis, P.J. Shami, S.N. Mason, D.L. Sauls, W.A. Dittman, E.R. Wood, G.K. Smith, B. McDonald, K.E. Bachus, and et al., *Human mononuclear phagocyte inducible nitric oxide synthase (iNOS): analysis of iNOS mRNA, iNOS protein, biopterin, and nitric oxide production by blood monocytes and peritoneal macrophages*. Blood, 1995. **86**(3): p. 1184-95.
134. de Vera, M.E., R.A. Shapiro, A.K. Nussler, J.S. Mudgett, R.L. Simmons, S.M. Morris, Jr., T.R. Billiar, and D.A. Geller, *Transcriptional regulation of human inducible nitric oxide synthase (NOS2) gene by cytokines: initial analysis of the human NOS2 promoter*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(3): p. 1054-9.
135. Kleinert, H., P.M. Schwarz, and U. Forstermann, *Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase*. Biol Chem, 2003. **384**(10-11): p. 1343-64.
136. Ferreiro, C.R., A.C. Chagas, M.H. Carvalho, A.P. Dantas, M.B. Jatene, L.C. Bento De Souza, and P. Lemos Da Luz, *Influence of hypoxia on nitric oxide synthase activity and gene expression in children with congenital heart disease: a novel pathophysiological adaptive mechanism*. Circulation, 2001. **103**(18): p. 2272-6.
137. Geller, D.A., M.E. de Vera, D.A. Russell, R.A. Shapiro, A.K. Nussler, R.L. Simmons, and T.R. Billiar, *A central role for IL-1 beta in the in vitro and in vivo regulation of hepatic inducible nitric oxide synthase. IL-1 beta induces hepatic nitric oxide synthesis*. J Immunol, 1995. **155**(10): p. 4890-8.

138. Koide, M., Y. Kawahara, T. Tsuda, and M. Yokoyama, *Cytokine-induced expression of an inducible type of nitric oxide synthase gene in cultured vascular smooth muscle cells*. FEBS Lett, 1993. **318**(3): p. 213-7.
139. Markewitz, B.A., J.R. Michael, and D.E. Kohan, *Cytokine-induced expression of a nitric oxide synthase in rat renal tubule cells*. J Clin Invest, 1993. **91**(5): p. 2138-43.
140. Stuehr, D.J., H.J. Cho, N.S. Kwon, M.F. Weise, and C.F. Nathan, *Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD- and FMN-containing flavoprotein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991b. **88**(17): p. 7773-7.
141. Lowenstein, C.J., E.W. Alley, P. Raval, A.M. Snowman, S.H. Snyder, S.W. Russell, and W.J. Murphy, *Macrophage nitric oxide synthase gene: two upstream regions mediate induction by interferon gamma and lipopolysaccharide*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(20): p. 9730-4.
142. Goldring, C.E., S. Reveneau, M. Algarte, and J.F. Jeannin, *In vivo footprinting of the mouse inducible nitric oxide synthase gene: inducible protein occupation of numerous sites including Oct and NF-IL6*. Nucleic Acids Res, 1996. **24**(9): p. 1682-7.
143. Xie, Q.W., Y. Kashiwabara, and C. Nathan, *Role of transcription factor NF-kappa B/Rel in induction of nitric oxide synthase*. J Biol Chem, 1994. **269**(7): p. 4705-8.
144. Nunokawa, Y., S. Oikawa, and S. Tanaka, *Human inducible nitric oxide synthase gene is transcriptionally regulated by nuclear factor-kappaB dependent mechanism*. Biochem Biophys Res Commun, 1996. **223**(2): p. 347-52.
145. Kleinert, H., C. Euchenhofer, I. Ihrig-Biedert, and U. Forstermann, *Glucocorticoids inhibit the induction of nitric oxide synthase II by down-regulating cytokine-induced activity of transcription factor nuclear factor-kappa B*. Mol Pharmacol, 1996. **49**(1): p. 15-21.
146. Kleinert, H., T. Wallerath, G. Fritz, I. Ihrig-Biedert, F. Rodriguez-Pascual, D.A. Geller, and U. Forstermann, *Cytokine induction of NO synthase II in human DLD-1 cells: roles of the JAK-STAT, AP-1 and NF-kappaB-signaling pathways*. Br J Pharmacol, 1998b. **125**(1): p. 193-201.
147. Schindler, C. and J.E. Darnell, Jr., *Transcriptional responses to polypeptide ligands: the JAK-STAT pathway*. Annu Rev Biochem, 1995. **64**: p. 621-51.
148. Singh, K., J.L. Balligand, T.A. Fischer, T.W. Smith, and R.A. Kelly, *Regulation of cytokine-inducible nitric oxide synthase in cardiac myocytes and microvascular*

- endothelial cells. Role of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 (ERK1/ERK2) and STAT1 alpha.* J Biol Chem, 1996. **271**(2): p. 1111-7.
149. Nishiya, T., T. Uehara, H. Edamatsu, Y. Kaziro, H. Itoh, and Y. Nomura, *Activation of Stat1 and subsequent transcription of inducible nitric oxide synthase gene in C6 glioma cells is independent of interferon-gamma-induced MAPK activation that is mediated by p21ras.* FEBS Lett, 1997. **408**(1): p. 33-8.
 150. Meraz, M.A., J.M. White, K.C. Sheehan, E.A. Bach, S.J. Rodig, A.S. Dighe, D.H. Kaplan, J.K. Riley, A.C. Greenlund, D. Campbell, K. Carver-Moore, R.N. DuBois, R. Clark, M. Aguet, and R.D. Schreiber, *Targeted disruption of the Stat1 gene in mice reveals unexpected physiologic specificity in the JAK-STAT signaling pathway.* Cell, 1996. **84**(3): p. 431-42.
 151. Gao, J., D.C. Morrison, T.J. Parmely, S.W. Russell, and W.J. Murphy, *An interferon-gamma-activated site (GAS) is necessary for full expression of the mouse iNOS gene in response to interferon-gamma and lipopolysaccharide.* J Biol Chem, 1997. **272**(2): p. 1226-30.
 152. Kitamura, Y., H. Takahashi, Y. Nomura, and T. Taniguchi, *Possible involvement of Janus kinase Jak2 in interferon-gamma induction of nitric oxide synthase in rat glial cells.* Eur J Pharmacol, 1996. **306**(1-3): p. 297-306.
 153. Doi, M., M. Shichiri, K. Katsuyama, S. Ishimaru, and Y. Hirata, *Cytokine-activated Jak-2 is involved in inducible nitric oxide synthase expression independent from NF-kappaB activation in vascular smooth muscle cells.* Atherosclerosis, 2002. **160**(1): p. 123-32.
 154. Kleinert, H., C. Euchenhofer, G. Fritz, I. Ihrig-Biedert, and U. Forstermann, *Involvement of protein kinases in the induction of NO synthase II in human DLD-1 cells.* Br J Pharmacol, 1998a. **123**(8): p. 1716-22.
 155. Ganster, R.W., B.S. Taylor, L. Shao, and D.A. Geller, *Complex regulation of human inducible nitric oxide synthase gene transcription by Stat 1 and NF-kappa B.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(15): p. 8638-43.
 156. Muhl, H., D. Kunz, and J. Pfeilschifter, *Expression of nitric oxide synthase in rat glomerular mesangial cells mediated by cyclic AMP.* Br J Pharmacol, 1994. **112**(1): p. 1-8.
 157. Cavicchi, M. and B.J. Whittle, *Potentiation of cytokine induced iNOS expression in the human intestinal epithelial cell line, DLD-1, by cyclic AMP.* Gut, 1999. **45**(3): p. 367-74.

158. Tedeschi, E., M. Menegazzi, D. Margotto, H. Suzuki, U. Forstermann, and H. Kleinert, *Anti-inflammatory actions of St. John's wort: inhibition of human inducible nitric-oxide synthase expression by down-regulating signal transducer and activator of transcription-1alpha (STAT-1alpha) activation*. J Pharmacol Exp Ther, 2003. **307**(1): p. 254-61.
159. Rodriguez-Pascual, F., M. Hausding, I. Ihrig-Biedert, H. Furneaux, A.P. Levy, U. Forstermann, and H. Kleinert, *Complex contribution of the 3'-untranslated region to the expressional regulation of the human inducible nitric-oxide synthase gene. Involvement of the RNA-binding protein HuR*. J Biol Chem, 2000. **275**(34): p. 26040-9.
160. Linn, S.C., P.J. Morelli, I. Edry, S.E. Cottongim, C. Szabo, and A.L. Salzman, *Transcriptional regulation of human inducible nitric oxide synthase gene in an intestinal epithelial cell line*. Am J Physiol, 1997. **272**(6 Pt 1): p. G1499-508.
161. Mitchell, P. and D. Tollervey, *mRNA stability in eukaryotes*. Curr Opin Genet Dev, 2000. **10**(2): p. 193-8.
162. Misquitta, C.M., V.R. Iyer, E.S. Werstiuk, and A.K. Grover, *The role of 3'-untranslated region (3'-UTR) mediated mRNA stability in cardiovascular pathophysiology*. Mol Cell Biochem, 2001. **224**(1-2): p. 53-67.
163. Pautz, A., K. Linker, T. Hubrich, R. Korhonen, S. Altenhofer, and H. Kleinert, *The polypyrimidine tract-binding protein (PTB) is involved in the post-transcriptional regulation of human inducible nitric oxide synthase expression*. J Biol Chem, 2006. **281**(43): p. 32294-302.
164. Fechir, M., K. Linker, A. Pautz, T. Hubrich, and H. Kleinert, *The RNA binding protein TIAR is involved in the regulation of human iNOS expression*. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 2005b. **51**(3): p. 299-305.
165. Fechir, M., K. Linker, A. Pautz, T. Hubrich, U. Förstermann, F. Rodriguez-Pascual, and H. Kleinert, *Tristetraprolin regulates the expression of the human inducible nitric-oxide synthase gene*. Mol Pharmacol, 2005a. **67**(6): p. 2148-61.
166. Linker, K., A. Pautz, M. Fechir, T. Hubrich, J. Greeve, and H. Kleinert, *Involvement of KSRP in the post-transcriptional regulation of human iNOS expression-complex interplay of KSRP with TTP and HuR*. Nucleic Acids Res, 2005. **33**(15): p. 4813-27.
167. Kröncke, K.D., K. Fehsel, and V. Kolb-Bachofen, *Inducible nitric oxide synthase in human diseases*. Clin Exp Immunol, 1998. **113**(2): p. 147-56.

168. Bogdan, C., *Nitric oxide and the immune response*. Nat Immunol, 2001. **2**(10): p. 907-16.
169. Jaiswal, M., N.F. LaRusso, and G.J. Gores, *Nitric oxide in gastrointestinal epithelial cell carcinogenesis: linking inflammation to oncogenesis*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2001. **281**(3): p. G626-34.
170. Wink, D.A., K.S. Kasprzak, C.M. Maragos, R.K. Elespuru, M. Misra, T.M. Dunams, T.A. Cebula, W.H. Koch, A.W. Andrews, J.S. Allen, and et al., *DNA deaminating ability and genotoxicity of nitric oxide and its progenitors*. Science, 1991. **254**(5034): p. 1001-3.
171. Jenkins, D.C., I.G. Charles, L.L. Thomsen, D.W. Moss, L.S. Holmes, S.A. Baylis, P. Rhodes, K. Westmore, P.C. Emson, and S. Moncada, *Roles of nitric oxide in tumor growth*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(10): p. 4392-6.
172. Ambs, S., M.O. Ogunfusika, W.G. Merriam, W.P. Bennett, T.R. Billiar, and C.C. Harris, *Up-regulation of inducible nitric oxide synthase expression in cancer-prone p53 knockout mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998a. **95**(15): p. 8823-8.
173. Li, J., T.R. Billiar, R.V. Talanian, and Y.M. Kim, *Nitric oxide reversibly inhibits seven members of the caspase family via S-nitrosylation*. Biochem Biophys Res Commun, 1997. **240**(2): p. 419-24.
174. Harris, C.C. and M. Hollstein, *Clinical implications of the p53 tumor-suppressor gene*. N Engl J Med, 1993. **329**(18): p. 1318-27.
175. Tsuji, S., M. Tsujii, W.H. Sun, E.S. Gunawan, H. Murata, S. Kawano, and M. Hori, *Helicobacter pylori and gastric carcinogenesis*. J Clin Gastroenterol, 1997. **25 Suppl 1**: p. S186-97.
176. Szabo, C. and H. Ohshima, *DNA damage induced by peroxynitrite: subsequent biological effects*. Nitric Oxide, 1997. **1**(5): p. 373-85.
177. Wink, D.A. and J. Laval, *The Fpg protein, a DNA repair enzyme, is inhibited by the biomediator nitric oxide in vitro and in vivo*. Carcinogenesis, 1994. **15**(10): p. 2125-9.
178. Singer, II, D.W. Kawka, S. Scott, J.R. Weidner, R.A. Mumford, T.E. Riehl, and W.F. Stenson, *Expression of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in colonic epithelium in inflammatory bowel disease*. Gastroenterology, 1996. **111**(4): p. 871-85.
179. Dijkstra, G., H. Moshage, H.M. van Dullemen, A. de Jager-Krikken, A.T. Tiebosch, J.H. Kleibeuker, P.L. Jansen, and H. van Goor, *Expression of nitric oxide synthases*

- and formation of nitrotyrosine and reactive oxygen species in inflammatory bowel disease.* J Pathol, 1998. **186**(4): p. 416-21.
180. Ambs, S., W.G. Merriam, W.P. Bennett, E. Felley-Bosco, M.O. Ogunfusika, S.M. Oser, S. Klein, P.G. Shields, T.R. Billiar, and C.C. Harris, *Frequent nitric oxide synthase-2 expression in human colon adenomas: implication for tumor angiogenesis and colon cancer progression.* Cancer Res, 1998b. **58**(2): p. 334-41.
 181. Kojima, M., T. Morisaki, Y. Tsukahara, A. Uchiyama, Y. Matsunari, R. Mibu, and M. Tanaka, *Nitric oxide synthase expression and nitric oxide production in human colon carcinoma tissue.* J Surg Oncol, 1999. **70**(4): p. 222-9.
 182. Szaleczky, E., L. Pronai, H. Nakazawa, and Z. Tulassay, *Evidence of in vivo peroxynitrite formation in patients with colorectal carcinoma, higher plasma nitrate/nitrite levels, and lower protection against oxygen free radicals.* J Clin Gastroenterol, 2000. **30**(1): p. 47-51.
 183. Thomsen, L.L., D.W. Miles, L. Happerfield, L.G. Bobrow, R.G. Knowles, and S. Moncada, *Nitric oxide synthase activity in human breast cancer.* Br J Cancer, 1995. **72**(1): p. 41-4.
 184. Vakkala, M., K. Kahlos, E. Lakari, P. Paakko, V. Kinnula, and Y. Soini, *Inducible nitric oxide synthase expression, apoptosis, and angiogenesis in in situ and invasive breast carcinomas.* Clin Cancer Res, 2000. **6**(6): p. 2408-16.
 185. Lo, H.W., S.C. Hsu, M. Ali-Seyed, M. Gunduz, W. Xia, Y. Wei, G. Bartholomeusz, J.Y. Shih, and M.C. Hung, *Nuclear interaction of EGFR and STAT3 in the activation of the iNOS/NO pathway.* Cancer Cell, 2005. **7**(6): p. 575-89.
 186. Marrogi, A.J., W.D. Travis, J.A. Welsh, M.A. Khan, H. Rahim, H. Tazelaar, P. Pairolero, V. Trastek, J. Jett, N.E. Caporaso, L.A. Liotta, and C.C. Harris, *Nitric oxide synthase, cyclooxygenase 2, and vascular endothelial growth factor in the angiogenesis of non-small cell lung carcinoma.* Clin Cancer Res, 2000. **6**(12): p. 4739-44.
 187. Aaltomaa, S.H., P.K. Lipponen, J. Viitanen, J.P. Kankkunen, M.Y. Ala-Opas, and V.M. Kosma, *The prognostic value of inducible nitric oxide synthase in local prostate cancer.* BJU Int, 2000. **86**(3): p. 234-9.
 188. Aaltomaa, S.H., P.K. Lipponen, and V.M. Kosma, *Inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression and its prognostic value in prostate cancer.* Anticancer Res, 2001. **21**(4B): p. 3101-6.

189. Uotila, P., E. Valve, P. Martikainen, M. Nevalainen, M. Nurmi, and P. Harkonen, *Increased expression of cyclooxygenase-2 and nitric oxide synthase-2 in human prostate cancer*. Urol Res, 2001. **29**(1): p. 23-8.
190. Swana, H.S., S.D. Smith, P.L. Perrotta, N. Saito, M.A. Wheeler, and R.M. Weiss, *Inducible nitric oxide synthase with transitional cell carcinoma of the bladder*. J Urol, 1999. **161**(2): p. 630-4.
191. Hayashi, H., M. Kuwahara, N. Fujisaki, M. Furihata, Y. Ohtsuki, and S. Kagawa, *Immunohistochemical findings of nitric oxide synthase expression in urothelial transitional cell carcinoma including dysplasia*. Oncol Rep, 2001a. **8**(6): p. 1275-9.
192. Ambs, S., W.P. Bennett, W.G. Merriam, M.O. Ogunfusika, S.M. Oser, A.M. Harrington, P.G. Shields, E. Felley-Bosco, S.P. Hussain, and C.C. Harris, *Relationship between p53 mutations and inducible nitric oxide synthase expression in human colorectal cancer*. J Natl Cancer Inst, 1999. **91**(1): p. 86-8.
193. Nozoe, T., M. Yasuda, M. Honda, S. Inutsuka, and D. Korenaga, *Immunohistochemical expression of cytokine induced nitric oxide synthase in colorectal carcinoma*. Oncol Rep, 2002. **9**(3): p. 521-4.
194. Cianchi, F., C. Cortesini, O. Fantappie, L. Messerini, N. Schiavone, A. Vannacci, S. Nistri, I. Sardi, G. Baroni, C. Marzocca, F. Perna, R. Mazzanti, P. Bechi, and E. Masini, *Inducible nitric oxide synthase expression in human colorectal cancer: correlation with tumor angiogenesis*. Am J Pathol, 2003. **162**(3): p. 793-801.
195. Massi, D., A. Franchi, I. Sardi, L. Magnelli, M. Paglierani, L. Borgognoni, U. Maria Reali, and M. Santucci, *Inducible nitric oxide synthase expression in benign and malignant cutaneous melanocytic lesions*. J Pathol, 2001. **194**(2): p. 194-200.
196. Chin, K., Y. Kurashima, T. Ogura, H. Tajiri, S. Yoshida, and H. Esumi, *Induction of vascular endothelial growth factor by nitric oxide in human glioblastoma and hepatocellular carcinoma cells*. Oncogene, 1997. **15**(4): p. 437-42.
197. Papapetropoulos, A., G. Garcia-Cardena, J.A. Madri, and W.C. Sessa, *Nitric oxide production contributes to the angiogenic properties of vascular endothelial growth factor in human endothelial cells*. J Clin Invest, 1997. **100**(12): p. 3131-9.
198. Andrew, P.J., H. Harant, and I.J. Lindley, *Nitric oxide regulates IL-8 expression in melanoma cells at the transcriptional level*. Biochem Biophys Res Commun, 1995. **214**(3): p. 949-56.
199. Xie, K., *Interleukin-8 and human cancer biology*. Cytokine Growth Factor Rev, 2001. **12**(4): p. 375-91.

200. Xiong, Q., Q. Shi, X. Le, B. Wang, and K. Xie, *Regulation of interleukin-8 expression by nitric oxide in human pancreatic adenocarcinoma*. J Interferon Cytokine Res, 2001. **21**(7): p. 529-37.
201. Hellmuth, M., J. Paulukat, R. Ninic, J. Pfeilschifter, and H. Muhl, *Nitric oxide differentially regulates pro- and anti-angiogenic markers in DLD-1 colon carcinoma cells*. FEBS Lett, 2004. **563**(1-3): p. 98-102.
202. Andrade, S.P., I.R. Hart, and P.J. Piper, *Inhibitors of nitric oxide synthase selectively reduce flow in tumor-associated neovasculature*. Br J Pharmacol, 1992. **107**(4): p. 1092-5.
203. Vamvakas, S. and H.H. Schmidt, *Just say NO to cancer?* J Natl Cancer Inst, 1997. **89**(6): p. 406-7.
204. Cianchi, F., C. Cortesini, O. Fantappie, L. Messerini, I. Sardi, N. Lasagna, F. Perna, V. Fabbroni, A. Di Felice, G. Perigli, R. Mazzanti, and E. Masini, *Cyclooxygenase-2 activation mediates the proangiogenic effect of nitric oxide in colorectal cancer*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(8): p. 2694-704.
205. Maeda, H., Y. Noguchi, K. Sato, and T. Akaike, *Enhanced vascular permeability in solid tumor is mediated by nitric oxide and inhibited by both new nitric oxide scavenger and nitric oxide synthase inhibitor*. Jpn J Cancer Res, 1994. **85**(4): p. 331-4.
206. Ray, J.M. and W.G. Stetler-Stevenson, *The role of matrix metalloproteases and their inhibitors in tumour invasion, metastasis and angiogenesis*. Eur Respir J, 1994. **7**(11): p. 2062-72.
207. Tozer, G.M., V.E. Prise, and D.J. Chaplin, *Inhibition of nitric oxide synthase induces a selective reduction in tumor blood flow that is reversible with L-arginine*. Cancer Res, 1997. **57**(5): p. 948-55.
208. Lavoie, P.M., J. Thibodeau, F. Erard, and R.P. Sekaly, *Understanding the mechanism of action of bacterial superantigens from a decade of research*. Immunol Rev, 1999. **168**: p. 257-69.
209. Wright, S.D., R.A. Ramos, P.S. Tobias, R.J. Ulevitch, and J.C. Mathison, *CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein*. Science, 1990. **249**(4975): p. 1431-3.
210. Pugin, J., I.D. Heumann, A. Tomasz, V.V. Kravchenko, Y. Akamatsu, M. Nishijima, M.P. Glauser, P.S. Tobias, and R.J. Ulevitch, *CD14 is a pattern recognition receptor*. Immunity, 1994. **1**(6): p. 509-16.

211. Landmann, R., W. Zimmerli, S. Sansano, S. Link, A. Hahn, M.P. Glauser, and T. Calandra, *Increased circulating soluble CD14 is associated with high mortality in gram-negative septic shock*. J Infect Dis, 1995. **171**(3): p. 639-44.
212. Aderem, A. and R.J. Ulevitch, *Toll-like receptors in the induction of the innate immune response*. Nature, 2000. **406**(6797): p. 782-7.
213. Vasselon, T. and P.A. Detmers, *Toll receptors: a central element in innate immune responses*. Infect Immun, 2002. **70**(3): p. 1033-41.
214. Winkler, P., D. Ghadimi, J. Schrezenmeir, and J.P. Kraehenbuhl, *Molecular and cellular basis of microflora-host interactions*. J Nutr, 2007. **137**(3 Suppl 2): p. 756S-72S.
215. Takeuchi, O., K. Hoshino, T. Kawai, H. Sanjo, H. Takada, T. Ogawa, K. Takeda, and S. Akira, *Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components*. Immunity, 1999. **11**(4): p. 443-51.
216. Hayashi, F., K.D. Smith, A. Ozinsky, T.R. Hawn, E.C. Yi, D.R. Goodlett, J.K. Eng, S. Akira, D.M. Underhill, and A. Aderem, *The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5*. Nature, 2001b. **410**(6832): p. 1099-103.
217. Bauer, S., C.J. Kirschning, H. Hacker, V. Redecke, S. Hausmann, S. Akira, H. Wagner, and G.B. Lipford, *Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(16): p. 9237-42.
218. Alexopoulou, L., A.C. Holt, R. Medzhitov, and R.A. Flavell, *Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3*. Nature, 2001. **413**(6857): p. 732-8.
219. Shimazu, R., S. Akashi, H. Ogata, Y. Nagai, K. Fukudome, K. Miyake, and M. Kimoto, *MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4*. J Exp Med, 1999. **189**(11): p. 1777-82.
220. Tattoli, I., L.H. Travassos, L.A. Carneiro, J.G. Magalhaes, and S.E. Girardin, *The Nodosome: Nod1 and Nod2 control bacterial infections and inflammation*. Semin Immunopathol, 2007. **29**(3): p. 289-301.
221. Strober, W., P.J. Murray, A. Kitani, and T. Watanabe, *Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(1): p. 9-20.
222. Liu, C., Z. Xu, D. Gupta, and R. Dziarski, *Peptidoglycan recognition proteins: a novel family of four human innate immunity pattern recognition molecules*. J Biol Chem, 2001. **276**(37): p. 34686-94.

223. Dinarello, C.A., *Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock*. Chest, 1997. **112**(6 Suppl): p. 321S-329S.
224. Cohen, J., *The immunopathogenesis of sepsis*. Nature, 2002. **420**(6917): p. 885-91.
225. Lederer, J.A., M.L. Rodrick, and J.A. Mannick, *The effects of injury on the adaptive immune response*. Shock, 1999. **11**(3): p. 153-9.
226. Oberholzer, A., C. Oberholzer, and L.L. Moldawer, *Sepsis syndromes: understanding the role of innate and acquired immunity*. Shock, 2001. **16**(2): p. 83-96.
227. O'Sullivan, S.T., J.A. Lederer, A.F. Horgan, D.H. Chin, J.A. Mannick, and M.L. Rodrick, *Major injury leads to predominance of the T helper-2 lymphocyte phenotype and diminished interleukin-12 production associated with decreased resistance to infection*. Ann Surg, 1995. **222**(4): p. 482-90; discussion 490-2.
228. Heidecke, C.D., T. Hensler, H. Weighardt, N. Zantl, H. Wagner, J.R. Siewert, and B. Holzmann, *Selective defects of T lymphocyte function in patients with lethal intraabdominal infection*. Am J Surg, 1999. **178**(4): p. 288-92.
229. Pellegrini, J.D., A.K. De, K. Kodys, J.C. Puyana, R.K. Furse, and C. Miller-Graziano, *Relationships between T lymphocyte apoptosis and anergy following trauma*. J Surg Res, 2000. **88**(2): p. 200-6.
230. Hotchkiss, R.S., P.E. Swanson, B.D. Freeman, K.W. Tinsley, J.P. Cobb, G.M. Matuschak, T.G. Buchman, and I.E. Karl, *Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction*. Crit Care Med, 1999. **27**(7): p. 1230-51.
231. Hotchkiss, R.S., K.W. Tinsley, P.E. Swanson, R.E. Schmieg, Jr., J.J. Hui, K.C. Chang, D.F. Osborne, B.D. Freeman, J.P. Cobb, T.G. Buchman, and I.E. Karl, *Sepsis-induced apoptosis causes progressive profound depletion of B and CD4+ T lymphocytes in humans*. J Immunol, 2001. **166**(11): p. 6952-63.
232. Hotchkiss, R.S., K.W. Tinsley, P.E. Swanson, M.H. Grayson, D.F. Osborne, T.H. Wagner, J.P. Cobb, C. Coopersmith, and I.E. Karl, *Depletion of dendritic cells, but not macrophages, in patients with sepsis*. J Immunol, 2002. **168**(5): p. 2493-500.
233. Voll, R.E., M. Herrmann, E.A. Roth, C. Stach, J.R. Kalden, and I. Girkontaite, *Immunosuppressive effects of apoptotic cells*. Nature, 1997. **390**(6658): p. 350-1.
234. Green, D.R. and H.M. Beere, *Apoptosis. Gone but not forgotten*. Nature, 2000. **405**(6782): p. 28-9.

235. Fadok, V.A., D.L. Bratton, D.M. Rose, A. Pearson, R.A. Ezekewitz, and P.M. Henson, *A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells*. Nature, 2000. **405**(6782): p. 85-90.
236. Docke, W.D., F. Randow, U. Syrbe, D. Krausch, K. Asadullah, P. Reinke, H.D. Volk, and W. Kox, *Monocyte deactivation in septic patients: restoration by IFN-gamma treatment*. Nat Med, 1997. **3**(6): p. 678-81.
237. Fink, M.P. and R.L. Delude, *Epithelial barrier dysfunction: a unifying theme to explain the pathogenesis of multiple organ dysfunction at the cellular level*. Crit Care Clin, 2005. **21**(2): p. 177-96.
238. Brealey, D., M. Brand, I. Hargreaves, S. Heales, J. Land, R. Smolenski, N.A. Davies, C.E. Cooper, and M. Singer, *Association between mitochondrial dysfunction and severity and outcome of septic shock*. Lancet, 2002. **360**(9328): p. 219-23.
239. Hodge, D.R., E.M. Hurt, and W.L. Farrar, *The role of IL-6 and STAT3 in inflammation and cancer*. Eur J Cancer, 2005. **41**(16): p. 2502-12.
240. Bromberg, J., *Stat proteins and oncogenesis*. J Clin Invest, 2002. **109**(9): p. 1139-42.
241. Haura, E.B., J. Turkson, and R. Jove, *Mechanisms of disease: Insights into the emerging role of signal transducers and activators of transcription in cancer*. Nat Clin Pract Oncol, 2005. **2**(6): p. 315-24.
242. Mudter, J., B. Weigmann, B. Bartsch, R. Kiesslich, D. Strand, P.R. Galle, H.A. Lehr, J. Schmidt, and M.F. Neurath, *Activation pattern of signal transducers and activators of transcription (STAT) factors in inflammatory bowel diseases*. Am J Gastroenterol, 2005. **100**(1): p. 64-72.
243. Ma, X.T., S. Wang, Y.J. Ye, R.Y. Du, Z.R. Cui, and M. Somsouk, *Constitutive activation of Stat3 signaling pathway in human colorectal carcinoma*. World J Gastroenterol, 2004. **10**(11): p. 1569-73.
244. Corvinus, F.M., C. Orth, R. Moriggl, S.A. Tsareva, S. Wagner, E.B. Pfitzner, D. Baus, R. Kaufmann, L.A. Huber, K. Zatloukal, H. Beug, P. Ohlschlager, A. Schutz, K.J. Halbhuber, and K. Friedrich, *Persistent STAT3 activation in colon cancer is associated with enhanced cell proliferation and tumor growth*. Neoplasia, 2005. **7**(6): p. 545-55.

245. Chavez, A.M., M.J. Morin, N. Unno, M.P. Fink, and R.A. Hodin, *Acquired interferon gamma responsiveness during Caco-2 cell differentiation: effects on iNOS gene expression*. Gut, 1999. **44**(5): p. 659-65.
246. Bookout, A.L. and D.J. Mangelsdorf, *Quantitative real-time PCR protocol for analysis of nuclear receptor signaling pathways*. Nucl Recept Signal, 2003. **1**: p. e012.
247. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. Methods, 2001. **25**(4): p. 402-8.
248. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson, *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1977. **74**(12): p. 5463-7.
249. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
250. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
251. Scheiermann, P., S. Hoegl, M. Revermann, D. Ahluwalia, J. Zander, K.A. Boost, T. Nguyen, B. Zwissler, H. Muhl, and C. Hofstetter, *Cecal Ligation and Incision: An Acute Onset Model of Severe Sepsis in Rats*. J Surg Res, 2008.
252. Vincent, J.L., R. Moreno, J. Takala, S. Willatts, A. De Mendonca, H. Bruining, C.K. Reinhart, P.M. Suter, and L.G. Thijs, *The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine*. Intensive Care Med, 1996. **22**(7): p. 707-10.
253. Le Gall, J.R., S. Lemeshow, and F. Saulnier, *A new Simplified Acute Physiology Score (SAPS II) based on a European/North American multicenter study*. JAMA, 1993. **270**(24): p. 2957-63.
254. Fechir, M., K. Linker, A. Pautz, T. Hubrich, U. Forstermann, F. Rodriguez-Pascual, and H. Kleinert, *Tristetraprolin regulates the expression of the human inducible nitric-oxide synthase gene*. Mol Pharmacol, 2005. **67**(6): p. 2148-61.
255. Paulukat, J., M. Bosmann, M. Nold, S. Garkisch, H. Kampfer, S. Frank, J. Raedle, S. Zeuzem, J. Pfeilschifter, and H. Muhl, *Expression and release of IL-18 binding protein in response to IFN-gamma*. J Immunol, 2001. **167**(12): p. 7038-43.

256. Luster, A.D. and J.V. Ravetch, *Biochemical characterization of a gamma interferon-inducible cytokine (IP-10)*. J Exp Med, 1987. **166**(4): p. 1084-97.
257. Murphy, S.L., *Deaths: final data for 1998*. Natl Vital Stat Rep, 2000. **48**(11): p. 1-105.
258. Angus, D.C., W.T. Linde-Zwirble, J. Lidicker, G. Clermont, J. Carcillo, and M.R. Pinsky, *Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care*. Crit Care Med, 2001. **29**(7): p. 1303-10.
259. Wichterman, K.A., A.E. Baue, and I.H. Chaudry, *Sepsis and septic shock--a review of laboratory models and a proposal*. J Surg Res, 1980. **29**(2): p. 189-201.
260. Weber, G.F., S. Schlautkotter, S. Kaiser-Moore, F. Altmayr, B. Holzmann, and H. Weighardt, *Inhibition of interleukin-22 attenuates bacterial load and organ failure during acute polymicrobial sepsis*. Infect Immun, 2007. **75**(4): p. 1690-7.
261. Riedemann, N.C., R.F. Guo, K.D. Bernacki, J.S. Reuben, I.J. Laudes, T.A. Neff, H. Gao, C. Speyer, V.J. Sarma, F.S. Zetoune, and P.A. Ward, *Regulation by C5a of neutrophil activation during sepsis*. Immunity, 2003. **19**(2): p. 193-202.
262. Guo, R.F., N.C. Riedemann, L. Sun, H. Gao, K.X. Shi, J.S. Reuben, V.J. Sarma, F.S. Zetoune, and P.A. Ward, *Divergent signaling pathways in phagocytic cells during sepsis*. J Immunol, 2006. **177**(2): p. 1306-13.
263. Singleton, K.D., V.E. Beckey, and P.E. Wischmeyer, *GLUTAMINE PREVENTS ACTIVATION OF NF-kappaB AND STRESS KINASE PATHWAYS, ATTENUATES INFLAMMATORY CYTOKINE RELEASE, AND PREVENTS ACUTE RESPIRATORY DISTRESS SYNDROME (ARDS) FOLLOWING SEPSIS*. Shock, 2005. **24**(6): p. 583-9.
264. Lala, P.K. and C. Chakraborty, *Role of nitric oxide in carcinogenesis and tumour progression*. Lancet Oncol, 2001. **2**(3): p. 149-56.
265. Itzkowitz, S.H. and X. Yio, *Inflammation and cancer IV. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: the role of inflammation*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2004. **287**(1): p. G7-17.
266. Kerbel, R. and J. Folkman, *Clinical translation of angiogenesis inhibitors*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(10): p. 727-39.
267. Siegert, A., C. Rosenberg, W.D. Schmitt, C. Denkert, and S. Hauptmann, *Nitric oxide of human colorectal adenocarcinoma cell lines promotes tumour cell invasion*. Br J Cancer, 2002. **86**(8): p. 1310-5.

268. Ambs, S., W.G. Merriam, M.O. Ogunfusika, W.P. Bennett, N. Ishibe, S.P. Hussain, E.E. Tzeng, D.A. Geller, T.R. Billiar, and C.C. Harris, *p53 and vascular endothelial growth factor regulate tumor growth of NOS2-expressing human carcinoma cells*. Nat Med, 1998c. **4**(12): p. 1371-6.
269. Forrester, K., S. Ambs, S.E. Lupold, R.B. Kapust, E.A. Spillare, W.C. Weinberg, E. Felley-Bosco, X.W. Wang, D.A. Geller, E. Tzeng, T.R. Billiar, and C.C. Harris, *Nitric oxide-induced p53 accumulation and regulation of inducible nitric oxide synthase expression by wild-type p53*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(6): p. 2442-7.
270. Hussain, S.P., P. Amstad, K. Raja, S. Ambs, M. Nagashima, W.P. Bennett, P.G. Shields, A.J. Ham, J.A. Swenberg, A.J. Marrogi, and C.C. Harris, *Increased p53 mutation load in noncancerous colon tissue from ulcerative colitis: a cancer-prone chronic inflammatory disease*. Cancer Res, 2000. **60**(13): p. 3333-7.
271. Takahashi, M., M. Mutoh, Y. Shoji, H. Sato, Y. Kamanaka, M. Naka, T. Maruyama, T. Sugimura, and K. Wakabayashi, *Suppressive effect of an inducible nitric oxide inhibitor, ONO-1714, on AOM-induced rat colon carcinogenesis*. Nitric Oxide, 2006. **14**(2): p. 130-6.
272. Rao, C.V., T. Kawamori, R. Hamid, and B.S. Reddy, *Chemoprevention of colonic aberrant crypt foci by an inducible nitric oxide synthase-selective inhibitor*. Carcinogenesis, 1999. **20**(4): p. 641-4.
273. Sherman, P.A., V.E. Laubach, B.R. Reep, and E.R. Wood, *Purification and cDNA sequence of an inducible nitric oxide synthase from a human tumor cell line*. Biochemistry, 1993. **32**(43): p. 11600-5.
274. Salzman, A., A.G. Denenberg, I. Ueta, M. O'Connor, S.C. Linn, and C. Szabo, *Induction and activity of nitric oxide synthase in cultured human intestinal epithelial monolayers*. Am J Physiol, 1996. **270**(4 Pt 1): p. G565-73.
275. Jenkins, D.C., I.G. Charles, S.A. Baylis, R. Lechuk, M.W. Radomski, and S. Moncada, *Human colon cancer cell lines show a diverse pattern of nitric oxide synthase gene expression and nitric oxide generation*. Br J Cancer, 1994. **70**(5): p. 847-9.
276. Ziesché, E., M. Bachmann, H. Kleinert, J. Pfeilschifter, and H. Mühl, *The interleukin-22/STAT3 pathway potentiates expression of inducible nitric-oxide synthase in human colon carcinoma cells*. J Biol Chem, 2007. **282**(22): p. 16006-15.

277. Jin, Y., D.E. Heck, G. DeGeorge, Y. Tian, and J.D. Laskin, *5-Fluorouracil suppresses nitric oxide biosynthesis in colon carcinoma cells*. *Cancer Res*, 1996. **56**(9): p. 1978-82.
278. Albina, J.E., *On the expression of nitric oxide synthase by human macrophages. Why no NO?* *J Leukoc Biol*, 1995. **58**(6): p. 643-9.
279. Sunitha, I., D.L. Meighen, D.P. Hartman, E.W. Thompson, S.W. Byers, and M.I. Avigan, *Hepatocyte growth factor stimulates invasion across reconstituted basement membranes by a new human small intestinal cell line*. *Clin Exp Metastasis*, 1994. **12**(2): p. 143-54.
280. Andersen, P., M.W. Pedersen, A. Woetmann, M. Villingshoj, M.T. Stockhausen, N. Odum, and H.S. Poulsen, *EGFR induces expression of IRF-1 via STAT1 and STAT3 activation leading to growth arrest of human cancer cells*. *Int J Cancer*, 2008. **122**(2): p. 342-9.
281. Kanda, N. and S. Watanabe, *Prolactin enhances interferon-gamma-induced production of CXC ligand 9 (CXCL9), CXCL10, and CXCL11 in human keratinocytes*. *Endocrinology*, 2007. **148**(5): p. 2317-25.
282. Kankuri, E., K. Vaali, R.G. Knowles, M. Lahde, R. Korpela, H. Vapaatalo, and E. Moilanen, *Suppression of acute experimental colitis by a highly selective inducible nitric-oxide synthase inhibitor, N-[3-(aminomethyl)benzyl]acetamidine*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2001. **298**(3): p. 1128-32.
283. Bone, R.C., R.A. Balk, F.B. Cerra, R.P. Dellinger, A.M. Fein, W.A. Knaus, R.M. Schein, and W.J. Sibbald, *Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine*. *Chest*, 1992. **101**(6): p. 1644-55.
284. Johnson, S.B., M. Lissauer, G.V. Bochicchio, R. Moore, A.S. Cross, and T.M. Scalea, *Gene expression profiles differentiate between sterile SIRS and early sepsis*. *Ann Surg*, 2007. **245**(4): p. 611-21.
285. Singh, S. and T.W. Evans, *Organ dysfunction during sepsis*. *Intensive Care Med*, 2006. **32**(3): p. 349-60.
286. Friedman, G., E. Silva, and J.L. Vincent, *Has the mortality of septic shock changed with time*. *Crit Care Med*, 1998. **26**(12): p. 2078-86.
287. Brun-Buisson, C., *The epidemiology of the systemic inflammatory response*. *Intensive Care Med*, 2000. **26 Suppl 1**: p. S64-74.

288. Thomas, L., *Germes*. N Engl J Med, 1972. **287**(11): p. 553-5.
289. Jacobs, E.R. and R.C. Bone, *Clinical indicators in sepsis and septic adult respiratory distress syndrome*. Med Clin North Am, 1986. **70**(4): p. 921-32.
290. O'Reilly, M., D.E. Newcomb, and D. Remick, *Endotoxin, sepsis, and the primrose path*. Shock, 1999. **12**(6): p. 411-20.
291. Fink, M.P. and S.O. Heard, *Laboratory models of sepsis and septic shock*. J Surg Res, 1990. **49**(2): p. 186-96.
292. Deitch, E.A., *Animal models of sepsis and shock: a review and lessons learned*. Shock, 1998. **9**(1): p. 1-11.
293. Bone, R.C., C.J. Fisher, Jr., T.P. Clemmer, G.J. Slotman, C.A. Metz, and R.A. Balk, *A controlled clinical trial of high-dose methylprednisolone in the treatment of severe sepsis and septic shock*. N Engl J Med, 1987. **317**(11): p. 653-8.
294. Ziegler, E.J., C.J. Fisher, Jr., C.L. Sprung, R.C. Straube, J.C. Sadoff, G.E. Foulke, C.H. Wortel, M.P. Fink, R.P. Dellinger, N.N. Teng, and et al., *Treatment of gram-negative bacteremia and septic shock with HA-1A human monoclonal antibody against endotoxin. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. The HA-1A Sepsis Study Group*. N Engl J Med, 1991. **324**(7): p. 429-36.
295. Greenman, R.L., R.M. Schein, M.A. Martin, R.P. Wenzel, N.R. MacIntyre, G. Emmanuel, H. Chmel, R.B. Kohler, M. McCarthy, J. Plouffe, and et al., *A controlled clinical trial of E5 murine monoclonal IgM antibody to endotoxin in the treatment of gram-negative sepsis. The XOMA Sepsis Study Group*. JAMA, 1991. **266**(8): p. 1097-102.
296. Bone, R.C., R.A. Balk, A.M. Fein, T.M. Perl, R.P. Wenzel, H.D. Reines, R.W. Quenzer, T.J. Iberti, N. Macintyre, and R.M. Schein, *A second large controlled clinical study of E5, a monoclonal antibody to endotoxin: results of a prospective, multicenter, randomized, controlled trial. The E5 Sepsis Study Group*. Crit Care Med, 1995. **23**(6): p. 994-1006.
297. Fisher, C.J., Jr., J.M. Agosti, S.M. Opal, S.F. Lowry, R.A. Balk, J.C. Sadoff, E. Abraham, R.M. Schein, and E. Benjamin, *Treatment of septic shock with the tumor necrosis factor receptor:Fc fusion protein. The Soluble TNF Receptor Sepsis Study Group*. N Engl J Med, 1996. **334**(26): p. 1697-702.
298. Abraham, E., R. Wunderink, H. Silverman, T.M. Perl, S. Nasraway, H. Levy, R. Bone, R.P. Wenzel, R. Balk, R. Allred, and et al., *Efficacy and safety of monoclonal antibody to human tumor necrosis factor alpha in patients with sepsis syndrome. A*

- randomized, controlled, double-blind, multicenter clinical trial. TNF-alpha MAb Sepsis Study Group. JAMA, 1995. 273(12): p. 934-41.*
299. Fisher, C.J., Jr., G.J. Slotman, S.M. Opal, J.P. Pribble, R.C. Bone, G. Emmanuel, D. Ng, D.C. Bloedow, and M.A. Catalano, *Initial evaluation of human recombinant interleukin-1 receptor antagonist in the treatment of sepsis syndrome: a randomized, open-label, placebo-controlled multicenter trial. Crit Care Med, 1994. 22(1): p. 12-21.*
 300. Bone, R.C., *Why sepsis trials fail. JAMA, 1996a. 276(7): p. 565-6.*
 301. Bone, R.C., *Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS, and CARS. Crit Care Med, 1996b. 24(7): p. 1125-8.*
 302. Kellum, J.A., L. Kong, M.P. Fink, L.A. Weissfeld, D.M. Yealy, M.R. Pinsky, J. Fine, A. Krichevsky, R.L. Delude, and D.C. Angus, *Understanding the inflammatory cytokine response in pneumonia and sepsis: results of the Genetic and Inflammatory Markers of Sepsis (GenIMS) Study. Arch Intern Med, 2007. 167(15): p. 1655-63.*
 303. Reinhart, K., T. Menges, B. Gardlund, J. Harm Zwaveling, M. Smithes, J.L. Vincent, J.M. Tellado, A. Salgado-Remigio, R. Zimlichman, S. Withington, K. Tschaikowsky, R. Brase, P. Damas, H. Kupper, J. Kempeni, J. Eiselstein, and M. Kaul, *Randomized, placebo-controlled trial of the anti-tumor necrosis factor antibody fragment afelimomab in hyperinflammatory response during severe sepsis: The RAMSES Study. Crit Care Med, 2001. 29(4): p. 765-9.*
 304. Panacek, E.A., J.C. Marshall, T.E. Albertson, D.H. Johnson, S. Johnson, R.D. MacArthur, M. Miller, W.T. Barchuk, S. Fischkoff, M. Kaul, L. Teoh, L. Van Meter, L. Daum, S. Lemeshow, G. Hicklin, and C. Doig, *Efficacy and safety of the monoclonal anti-tumor necrosis factor antibody F(ab')₂ fragment afelimomab in patients with severe sepsis and elevated interleukin-6 levels. Crit Care Med, 2004. 32(11): p. 2173-82.*
 305. McCloskey, R.V., R.C. Straube, C. Sanders, S.M. Smith, and C.R. Smith, *Treatment of septic shock with human monoclonal antibody HA-1A. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. CHESS Trial Study Group. Ann Intern Med, 1994. 121(1): p. 1-5.*
 306. Sebat, F., A.A. Musthafa, D. Johnson, A.A. Kramer, D. Shoffner, M. Eliason, K. Henry, and B. Spurlock, *Effect of a rapid response system for patients in shock on*

- time to treatment and mortality during 5 years*. Crit Care Med, 2007. **35**(11): p. 2568-75.
307. Rivers, E.P., J.A. Kruse, G. Jacobsen, K. Shah, M. Loomba, R. Otero, and E.W. Childs, *The influence of early hemodynamic optimization on biomarker patterns of severe sepsis and septic shock*. Crit Care Med, 2007. **35**(9): p. 2016-24.
 308. Rivers, E.P., V. Coba, and M. Whitmill, *Early goal-directed therapy in severe sepsis and septic shock: a contemporary review of the literature*. Curr Opin Anaesthesiol, 2008. **21**(2): p. 128-40.
 309. Rivers, E., B. Nguyen, S. Havstad, J. Ressler, A. Muzzin, B. Knoblich, E. Peterson, and M. Tomlanovich, *Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock*. N Engl J Med, 2001. **345**(19): p. 1368-77.
 310. Nguyen, H.B., S.W. Corbett, R. Steele, J. Banta, R.T. Clark, S.R. Hayes, J. Edwards, T.W. Cho, and W.A. Wittlake, *Implementation of a bundle of quality indicators for the early management of severe sepsis and septic shock is associated with decreased mortality*. Crit Care Med, 2007. **35**(4): p. 1105-12.
 311. Jones, A.E., A. Focht, J.M. Horton, and J.A. Kline, *Prospective external validation of the clinical effectiveness of an emergency department-based early goal-directed therapy protocol for severe sepsis and septic shock*. Chest, 2007. **132**(2): p. 425-32.
 312. Kumar, A., D. Roberts, K.E. Wood, B. Light, J.E. Parrillo, S. Sharma, R. Suppes, D. Feinstein, S. Zanotti, L. Taiberg, D. Gurka, and M. Cheang, *Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock*. Crit Care Med, 2006. **34**(6): p. 1589-96.
 313. Minneci, P.C., K.J. Deans, S.M. Banks, P.Q. Eichacker, and C. Natanson, *Meta-analysis: the effect of steroids on survival and shock during sepsis depends on the dose*. Ann Intern Med, 2004. **141**(1): p. 47-56.
 314. Soni, A., G.M. Pepper, P.M. Wyrwinski, N.E. Ramirez, R. Simon, T. Pina, H. Gruenspan, and C.E. Vaca, *Adrenal insufficiency occurring during septic shock: incidence, outcome, and relationship to peripheral cytokine levels*. Am J Med, 1995. **98**(3): p. 266-71.
 315. Rothwell, P.M., Z.F. Udwadia, and P.G. Lawler, *Cortisol response to corticotropin and survival in septic shock*. Lancet, 1991. **337**(8741): p. 582-3.

316. Annane, D., V. Seville, G. Troche, J.C. Raphael, P. Gajdos, and E. Bellissant, *A 3-level prognostic classification in septic shock based on cortisol levels and cortisol response to corticotropin*. JAMA, 2000. **283**(8): p. 1038-45.
317. McKee, J.I. and W.E. Finlay, *Cortisol replacement in severely stressed patients*. Lancet, 1983. **1**(8322): p. 484.
318. Keh, D., T. Boehnke, S. Weber-Cartens, C. Schulz, O. Ahlers, S. Bercker, H.D. Volk, W.D. Doecke, K.J. Falke, and H. Gerlach, *Immunologic and hemodynamic effects of "low-dose" hydrocortisone in septic shock: a double-blind, randomized, placebo-controlled, crossover study*. Am J Respir Crit Care Med, 2003. **167**(4): p. 512-20.
319. Briegel, J., W. Kellermann, H. Forst, M. Haller, M. Bittl, G.E. Hoffmann, M. Buchler, W. Uhl, and K. Peter, *Low-dose hydrocortisone infusion attenuates the systemic inflammatory response syndrome. The Phospholipase A2 Study Group*. Clin Investig, 1994. **72**(10): p. 782-7.
320. Boyer, A., K. Chadda, A. Salah, and D. Annane, *Glucocorticoid treatment in patients with septic shock: effects on vasopressor use and mortality*. Int J Clin Pharmacol Ther, 2006. **44**(7): p. 309-18.
321. Bollaert, P.E., C. Charpentier, B. Levy, M. Debouverie, G. Audibert, and A. Larcen, *Reversal of late septic shock with supraphysiologic doses of hydrocortisone*. Crit Care Med, 1998. **26**(4): p. 645-50.
322. Annane, D., V. Seville, C. Charpentier, P.E. Bollaert, B. Francois, J.M. Korach, G. Capellier, Y. Cohen, E. Azoulay, G. Troche, P. Chaumet-Riffaut, and E. Bellissant, *Effect of treatment with low doses of hydrocortisone and fludrocortisone on mortality in patients with septic shock*. JAMA, 2002. **288**(7): p. 862-71.
323. Briegel, J., H. Forst, M. Haller, G. Schelling, E. Kilger, G. Kuprat, B. Hemmer, T. Hummel, A. Lenhart, M. Heyduck, C. Stoll, and K. Peter, *Stress doses of hydrocortisone reverse hyperdynamic septic shock: a prospective, randomized, double-blind, single-center study*. Crit Care Med, 1999. **27**(4): p. 723-32.
324. Simmons, W.W., D. Ungureanu-Longrois, G.K. Smith, T.W. Smith, and R.A. Kelly, *Glucocorticoids regulate inducible nitric oxide synthase by inhibiting tetrahydrobiopterin synthesis and L-arginine transport*. J Biol Chem, 1996. **271**(39): p. 23928-37.
325. Kunz, D., G. Walker, W. Eberhardt, and J. Pfeilschifter, *Molecular mechanisms of dexamethasone inhibition of nitric oxide synthase expression in interleukin 1 beta-*

- stimulated mesangial cells: evidence for the involvement of transcriptional and posttranscriptional regulation.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(1): p. 255-9.
326. Tseng, Y.T., R. Wadhawan, J.P. Stabila, B.G. McGonnigal, and J.F. Padbury, *Molecular interactions between glucocorticoid and catecholamine signaling pathways.* J Allergy Clin Immunol, 2002. **110**(6 Suppl): p. S247-54.
327. Kavelaars, A., *Regulated expression of alpha-1 adrenergic receptors in the immune system.* Brain Behav Immun, 2002. **16**(6): p. 799-807.
328. Sriskandan, S. and D.M. Altmann, *The immunology of sepsis.* J Pathol, 2008. **214**(2): p. 211-23.
329. Hotchkiss, R.S. and I.E. Karl, *The pathophysiology and treatment of sepsis.* N Engl J Med, 2003. **348**(2): p. 138-50.
330. Feezor, R.J., C. Oberholzer, H.V. Baker, D. Novick, M. Rubinstein, L.L. Moldawer, J. Pribble, S. Souza, C.A. Dinarello, W. Ertel, and A. Oberholzer, *Molecular characterization of the acute inflammatory response to infections with gram-negative versus gram-positive bacteria.* Infect Immun, 2003. **71**(10): p. 5803-13.
331. Liaudet, L., C. Szabo, O.V. Evgenov, K.G. Murthy, P. Pacher, L. Virag, J.G. Mabley, A. Marton, F.G. Soriano, M.Y. Kirov, L.J. Bjertnaes, and A.L. Salzman, *Flagellin from gram-negative bacteria is a potent mediator of acute pulmonary inflammation in sepsis.* Shock, 2003. **19**(2): p. 131-7.
332. Eaves-Pyles, T., K. Murthy, L. Liaudet, L. Virag, G. Ross, F.G. Soriano, C. Szabo, and A.L. Salzman, *Flagellin, a novel mediator of Salmonella-induced epithelial activation and systemic inflammation: I kappa B alpha degradation, induction of nitric oxide synthase, induction of proinflammatory mediators, and cardiovascular dysfunction.* J Immunol, 2001. **166**(2): p. 1248-60.
333. Amadi-Obi, A., C.R. Yu, X. Liu, R.M. Mahdi, G.L. Clarke, R.B. Nussenblatt, I. Gery, Y.S. Lee, and C.E. Egwuagu, *TH17 cells contribute to uveitis and scleritis and are expanded by IL-2 and inhibited by IL-27/STAT1.* Nat Med, 2007. **13**(6): p. 711-8.
334. Prigent, H., V. Maxime, and D. Annane, *Clinical review: corticotherapy in sepsis.* Crit Care, 2004. **8**(2): p. 122-9.
335. Annane, D. and J.M. Cavaillon, *Corticosteroids in sepsis: from bench to bedside?* Shock, 2003. **20**(3): p. 197-207.
336. Allary, J. and D. Annane, *Glucocorticoids and sepsis.* Minerva Anesthesiol, 2005. **71**(12): p. 759-68.

337. Yin, K., E. Gribbin, and H. Wang, *Interferon-gamma inhibition attenuates lethality after cecal ligation and puncture in rats: implication of high mobility group box-1*. Shock, 2005. **24**(4): p. 396-401.
338. Suda, K., Y. Kitagawa, S. Ozawa, Y. Saikawa, M. Ueda, M. Ebina, S. Yamada, S. Hashimoto, S. Fukata, E. Abraham, I. Maruyama, M. Kitajima, and A. Ishizaka, *Anti-high-mobility group box chromosomal protein 1 antibodies improve survival of rats with sepsis*. World J Surg, 2006. **30**(9): p. 1755-62.
339. Safranek, R., N. Ishibashi, Y. Oka, H. Ozasa, K. Shirouzu, and M. Holecek, *Modulation of inflammatory response in sepsis by proteasome inhibition*. Int J Exp Pathol, 2006. **87**(5): p. 369-72.
340. Otero-Anton, E., A. Gonzalez-Quintela, A. Lopez-Soto, S. Lopez-Ben, J. Llovo, and L.F. Perez, *Cecal ligation and puncture as a model of sepsis in the rat: influence of the puncture size on mortality, bacteremia, endotoxemia and tumor necrosis factor alpha levels*. Eur Surg Res, 2001. **33**(2): p. 77-9.
341. Maier, S., T. Traeger, M. Entleutner, A. Westerholt, B. Kleist, N. Huser, B. Holzmann, A. Stier, K. Pfeffer, and C.D. Heidecke, *Cecal ligation and puncture versus colon ascendens stent peritonitis: two distinct animal models for polymicrobial sepsis*. Shock, 2004. **21**(6): p. 505-11.
342. Levy, M.M., M.P. Fink, J.C. Marshall, E. Abraham, D. Angus, D. Cook, J. Cohen, S.M. Opal, J.L. Vincent, and G. Ramsay, *2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference*. Crit Care Med, 2003. **31**(4): p. 1250-6.
343. Oberholzer, A., S.M. Souza, S.K. Tschoeke, C. Oberholzer, A. Abouhamze, J.P. Pribble, and L.L. Moldawer, *Plasma cytokine measurements augment prognostic scores as indicators of outcome in patients with severe sepsis*. Shock, 2005. **23**(6): p. 488-93.
344. Damas, P., J.L. Canivet, D. de Groote, Y. Vrindts, A. Albert, P. Franchimont, and M. Lamy, *Sepsis and serum cytokine concentrations*. Crit Care Med, 1997. **25**(3): p. 405-12.
345. Bozza, F.A., J.I. Salluh, A.M. Japiassu, M. Soares, E.F. Assis, R.N. Gomes, M.T. Bozza, H.C. Castro-Faria-Neto, and P.T. Bozza, *Cytokine profiles as markers of disease severity in sepsis: a multiplex analysis*. Crit Care, 2007. **11**(2): p. R49.
346. van der Poll, T., A. Marchant, C.V. Keogh, M. Goldman, and S.F. Lowry, *Interleukin-10 impairs host defense in murine pneumococcal pneumonia*. J Infect Dis, 1996. **174**(5): p. 994-1000.

347. Steinhauser, M.L., C.M. Hogaboam, S.L. Kunkel, N.W. Lukacs, R.M. Strieter, and T.J. Standiford, *IL-10 is a major mediator of sepsis-induced impairment in lung antibacterial host defense*. J Immunol, 1999. **162**(1): p. 392-9.
348. Greenberger, M.J., R.M. Strieter, S.L. Kunkel, J.M. Danforth, R.E. Goodman, and T.J. Standiford, *Neutralization of IL-10 increases survival in a murine model of Klebsiella pneumonia*. J Immunol, 1995. **155**(2): p. 722-9.
349. Yamamoto, T., R.N. Allan, and M.R. Keighley, *Risk factors for intra-abdominal sepsis after surgery in Crohn's disease*. Dis Colon Rectum, 2000. **43**(8): p. 1141-5.
350. Abera, F.N., J.D. Lewis, D. Hass, J.L. Rombeau, B. Osborne, and G.R. Lichtenstein, *Corticosteroids and immunomodulators: postoperative infectious complication risk in inflammatory bowel disease patients*. Gastroenterology, 2003. **125**(2): p. 320-7.
351. Pelsers, M.M., W.T. Hermens, and J.F. Glatz, *Fatty acid-binding proteins as plasma markers of tissue injury*. Clin Chim Acta, 2005. **352**(1-2): p. 15-35.
352. Lieberman, J.M., J. Sacchettini, C. Marks, and W.H. Marks, *Human intestinal fatty acid binding protein: report of an assay with studies in normal volunteers and intestinal ischemia*. Surgery, 1997. **121**(3): p. 335-42.
353. Derikx, J.P., M. Poeze, A.A. van Bijnen, W.A. Buurman, and E. Heineman, *Evidence for intestinal and liver epithelial cell injury in the early phase of sepsis*. Shock, 2007. **28**(5): p. 544-8.
354. Ginzberg, H.H., V. Cherapanov, Q. Dong, A. Cantin, C.A. McCulloch, P.T. Shannon, and G.P. Downey, *Neutrophil-mediated epithelial injury during transmigration: role of elastase*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2001. **281**(3): p. G705-17.
355. Gatt, M., B.S. Reddy, and J. MacFie, *Review article: bacterial translocation in the critically ill--evidence and methods of prevention*. Aliment Pharmacol Ther, 2007. **25**(7): p. 741-57.
356. Han, X., M.P. Fink, R. Yang, and R.L. Delude, *Increased iNOS activity is essential for intestinal epithelial tight junction dysfunction in endotoxemic mice*. Shock, 2004. **21**(3): p. 261-70.
357. Wong, H.R., J.A. Carcillo, G. Burckart, N. Shah, and J.E. Janosky, *Increased serum nitrite and nitrate concentrations in children with the sepsis syndrome*. Crit Care Med, 1995. **23**(5): p. 835-42.

358. Shi, Y., H.Q. Li, C.K. Shen, J.H. Wang, S.W. Qin, R. Liu, and J. Pan, *Plasma nitric oxide levels in newborn infants with sepsis*. J Pediatr, 1993. **123**(3): p. 435-8.
359. Ochoa, J.B., A.O. Udekwu, T.R. Billiar, R.D. Curran, F.B. Cerra, R.L. Simmons, and A.B. Peitzman, *Nitrogen oxide levels in patients after trauma and during sepsis*. Ann Surg, 1991. **214**(5): p. 621-6.
360. Heemskerk, S., P. Pickkers, M.P. Bouw, A. Draisma, J.G. van der Hoeven, W.H. Peters, P. Smits, F.G. Russel, and R. Masereeuw, *Upregulation of renal inducible nitric oxide synthase during human endotoxemia and sepsis is associated with proximal tubule injury*. Clin J Am Soc Nephrol, 2006. **1**(4): p. 853-62.
361. Gomez-Jimenez, J., A. Salgado, M. Mourelle, M.C. Martin, R.M. Segura, R. Peracaula, and S. Moncada, *L-arginine: nitric oxide pathway in endotoxemia and human septic shock*. Crit Care Med, 1995. **23**(2): p. 253-8.
362. Evans, T., A. Carpenter, H. Kinderman, and J. Cohen, *Evidence of increased nitric oxide production in patients with the sepsis syndrome*. Circ Shock, 1993. **41**(2): p. 77-81.
363. Xie, X.Q., Y. Shinozawa, J. Sasaki, K. Takuma, S. Akaishi, S. Yamanouchi, T. Endo, R. Nomura, M. Kobayashi, D. Kudo, and N. Hojo, *The effects of arginine and selective inducible nitric oxide synthase inhibitor on pathophysiology of sepsis in a CLP model*. J Surg Res, 2008. **146**(2): p. 298-303.
364. Tracey, W.R., J. Tse, and G. Carter, *Lipopolysaccharide-induced changes in plasma nitrite and nitrate concentrations in rats and mice: pharmacological evaluation of nitric oxide synthase inhibitors*. J Pharmacol Exp Ther, 1995. **272**(3): p. 1011-5.
365. Nava, E., R.M. Palmer, and S. Moncada, *The role of nitric oxide in endotoxic shock: effects of NG-monomethyl-L-arginine*. J Cardiovasc Pharmacol, 1992. **20 Suppl 12**: p. S132-4.
366. Evans, T., A. Carpenter, A. Silva, and J. Cohen, *Inhibition of nitric oxide synthase in experimental gram-negative sepsis*. J Infect Dis, 1994. **169**(2): p. 343-9.
367. Bultinck, J., P. Sips, L. Vakaet, P. Brouckaert, and A. Cauwels, *Systemic NO production during (septic) shock depends on parenchymal and not on hematopoietic cells: in vivo iNOS expression pattern in (septic) shock*. FASEB J, 2006. **20**(13): p. 2363-5.

368. Pape, H.C., A. Dwenger, G. Regel, M. Auf'm'Kolck, F. Gollub, D. Wisner, J.A. Sturm, and H. Tscherne, *Increased gut permeability after multiple trauma*. Br J Surg, 1994. **81**(6): p. 850-2.
369. Langkamp-Henken, B., T.B. Donovan, L.M. Pate, C.D. Maull, and K.A. Kudsk, *Increased intestinal permeability following blunt and penetrating trauma*. Crit Care Med, 1995. **23**(4): p. 660-4.
370. Kompan, L., B. Kremzar, E. Gadzijev, and M. Prosek, *Effects of early enteral nutrition on intestinal permeability and the development of multiple organ failure after multiple injury*. Intensive Care Med, 1999. **25**(2): p. 157-61.
371. Faries, P.L., R.J. Simon, A.T. Martella, M.J. Lee, and G.W. Machiedo, *Intestinal permeability correlates with severity of injury in trauma patients*. J Trauma, 1998. **44**(6): p. 1031-5; discussion 1035-6.
372. Oudemans-van Straaten, H.M., P.G. Jansen, F.J. Hoek, S.J. van Deventer, A. Sturk, C.P. Stoutenbeek, G.N. Tytgat, C.R. Wildevuur, and L. Eysman, *Intestinal permeability, circulating endotoxin, and postoperative systemic responses in cardiac surgery patients*. J Cardiothorac Vasc Anesth, 1996. **10**(2): p. 187-94.
373. Doig, C.J., L.R. Sutherland, J.D. Sandham, G.H. Fick, M. Verhoef, and J.B. Meddings, *Increased intestinal permeability is associated with the development of multiple organ dysfunction syndrome in critically ill ICU patients*. Am J Respir Crit Care Med, 1998. **158**(2): p. 444-51.
374. Ammori, B.J., P.C. Leeder, R.F. King, G.R. Barclay, I.G. Martin, M. Larvin, and M.J. McMahon, *Early increase in intestinal permeability in patients with severe acute pancreatitis: correlation with endotoxemia, organ failure, and mortality*. J Gastrointest Surg, 1999. **3**(3): p. 252-62.
375. Wright, C.E., D.D. Rees, and S. Moncada, *Protective and pathological roles of nitric oxide in endotoxin shock*. Cardiovasc Res, 1992. **26**(1): p. 48-57.
376. Koepfel, T.A., J.C. Thies, P. Schemmer, M. Trauner, M.M. Gebhard, G. Otto, and S. Post, *Inhibition of nitric oxide synthesis in ischemia/reperfusion of the rat liver is followed by impairment of hepatic microvascular blood flow*. J Hepatol, 1997. **27**(1): p. 163-9.
377. Aranow, J.S., J. Zhuang, H. Wang, V. Larkin, M. Smith, and M.P. Fink, *A selective inhibitor of inducible in nitric oxide synthase prolongs survival in a rat model of bacterial peritonitis: comparison with two nonselective strategies*. Shock, 1996. **5**(2): p. 116-21.

378. Lopez, A., J.A. Lorente, J. Steingrub, J. Bakker, A. McLuckie, S. Willatts, M. Brockway, A. Anzueto, L. Holzapfel, D. Breen, M.S. Silverman, J. Takala, J. Donaldson, C. Arneson, G. Grove, S. Grossman, and R. Grover, *Multiple-center, randomized, placebo-controlled, double-blind study of the nitric oxide synthase inhibitor 546C88: effect on survival in patients with septic shock*. Crit Care Med, 2004. **32**(1): p. 21-30.
379. Strunk, V., K. Hahnenkamp, M. Schneuing, L.G. Fischer, and G.F. Rich, *Selective iNOS inhibition prevents hypotension in septic rats while preserving endothelium-dependent vasodilation*. Anesth Analg, 2001. **92**(3): p. 681-7.
380. Rosselet, A., F. Feihl, M. Markert, A. Gnaegi, C. Perret, and L. Liaudet, *Selective iNOS inhibition is superior to norepinephrine in the treatment of rat endotoxic shock*. Am J Respir Crit Care Med, 1998. **157**(1): p. 162-70.
381. Kadoi, Y. and F. Goto, *Effects of selective iNOS inhibition on systemic hemodynamics and mortality rate on endotoxic shock in streptozotocin-induced diabetic rats*. Shock, 2007. **28**(5): p. 602-9.
382. Benjamim, C.F., J.S. Silva, Z.B. Fortes, M.A. Oliveira, S.H. Ferreira, and F.Q. Cunha, *Inhibition of leukocyte rolling by nitric oxide during sepsis leads to reduced migration of active microbicidal neutrophils*. Infect Immun, 2002. **70**(7): p. 3602-10.
383. Asakura, H., R. Asamura, Y. Ontachi, T. Hayashi, M. Yamazaki, E. Morishita, K.I. Miyamoto, and S. Nakao, *Selective inducible nitric oxide synthase inhibition attenuates organ dysfunction and elevated endothelin levels in LPS-induced DIC model rats*. J Thromb Haemost, 2005. **3**(5): p. 1050-5.

Anhang

Oligonukleotide (Primer) für die RT-PCR

Alle Oligonukleotide (Primer) wurden bei Eurofins/MWG/Operon (Ebersberg) käuflich erworben.

IL-22 (human) (NM020525) 333bp

forward 5'-GCT AAG GAG GCT AGC TTG-3' (Verwendung auch als Sequenzierprimer)

reverse 5'-CAG CAA ATC CAG TTC TCC-3'

95°C 10min
95°C 30s
58°C 1min } 40x
72°C 1min
72°C 7min

IL-22R1 (human) (NM021258) 372bp

forward 5'-GTA TAA GAC GTA CGG AGA-3' (Verwendung auch als Sequenzierprimer)

reverse 5'TCC AAG GTG CAT TTG GTA-3'

95°C 10min
95°C 30s
52°C 30s } 35x
72°C 1min
72°C 7min

IL-10R2 (human) (NM000628) 292bp

forward 5'-CAT TGG GAA TGG TAC CAC-3' (Verwendung auch als Sequenzierprimer)

reverse 5'-CCA ATA ATG GTG TCA TCC AC-3'

95°C 10min
95°C 30s
52°C 30s } 35x
72°C 1min
72°C 7min

GAPDH (human) (NM002046) 452bp

forward 5'-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3'

reverse 5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3'

94°C 10min

94°C 30s

60°C 1min } 25x (DLD-1 Zellen) bzw. 23x (PBMC)

72°C 1min }

72°C 7min

Sonden für den RPA

Die Sonden wurden uns freundlicherweise von Prof. Dr. Stefan Frank (Institut für Allgemeine Pharmakologie und Toxikologie; Uniklinikum Frankfurt/Main) zur Verfügung gestellt.

iNOS (human)

NM000625 (Transkriptvariante 1) Nukleotide 3724-3469

NM153292 (Transkriptvariante 2) Nukleotide 3607-3352

GAPDH (human)

M33197 Nukleotide 961-1071

Sonden für die *real time* – PCR

Alle Sonden wurden käuflich bei Applied Biosystems (Darmstadt) erworben. Die entsprechenden Oligonukleotide (Primer) wurden über Eurofins/MWG/Operon (Ebersberg) bezogen.

IL-18BPα (human) (XM035063.1)

Sonde 5'-CAC CAG CCG GGA ACG TGG GA-3'

Primer forward 5'-ACC TCC CAG GCC GAC TG-3'

reverse 3'-CCT TGC ACA GCT GCG TAC C-3'

IL-22 (human)

Hs00220924_m1 (NM020525.4)

GAPDH (human)

4310884E (endogene Kontrolle; NM002046.3)

IL-22 (Ratte) (XM001081002)

Sonde 5'-GGC CAA GGA GGC CAG CCT TG-3'

Primer forward 5'-CAG CCA TAC ATC GTC AAC-3'

 reverse 5'-GAA CAG TTC CTC CCC GAT-3'

IL-17 (Ratte)

Rn01757168_m1 (NM001106897.1)

GAPDH (Ratte)

4352338E (endogene Kontrolle; NM017008.3)

Sonde für den EMSA

Die Sonde wurde käuflich bei Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg) erworben.

NFκB (Wildtyp) 5'-AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C-3'

Danksagung

Diese Arbeit wurde am Institut für Allgemeine Pharmakologie und Toxikologie der Medizinischen Fakultät der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main angefertigt.

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Josef Pfeilschifter für die Unterstützung meiner Arbeit und die hervorragenden Arbeitsbedingungen am Institut bedanken.

Besonders danken möchte ich PD Dr. Heiko Mühl für die Bereitstellung dieses spannenden Themas und seine ständige Bereitschaft, mir mit wissenschaftlichem Rat zur Seite zu stehen. Seine herzliche und intensive Betreuung, aber auch seine ansteckende Begeisterung hat maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Prof. Dr. Dieter Steinhilber möchte ich für die Möglichkeit danken, diese Dissertation unter seiner freundlichen Betreuung im Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie durchführen zu können.

Für die ausdauernde Bereitschaft, meine methodischen und wissenschaftlichen Fragen zu beantworten, und die herzliche Unterstützung während der gesamten Doktorarbeit, möchte ich Dr. Malte Bachmann danken.

Ein außerordentlich wichtiger Faktor für das Entstehen dieser Arbeit war die wunderbare, fröhliche und einzigartige, ja fast familiäre Atmosphäre im Labor. Ermöglicht wurde dies durch sympathische Menschen wie Marco, Malte, Silke, Christian, Bozena und Waltraud von der AG Mühl sowie (nicht zu vergessen) Itamar, Elke, Andreas, Dana und Christoph von der AG Frank.

Auch möchte ich mich bei allen anderen Arbeitsgruppen am Institut für ihre freundliche Unterstützung bedanken.

Ein besonders herzlicher Dank geht an Sven und meine Eltern, die mich während meiner Studienzeit und der anschließenden Promotion tatkräftig unterstützt haben und stets mit offenen Ohren und Armen für mich da waren (und sind).

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich mich bisher keiner Doktorprüfung unterzogen habe.

Frankfurt am Main, den

Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, dass ich die vorgelegte Dissertation über die **„Untersuchungen zur Bildung und Funktion von IL-22 bei entzündungsbedingter Immunaktivierung“** selbständig angefertigt und mich anderer Hilfsmittel als der in ihr angegebenen nicht bedient habe, insbesondere, dass aus Schriften Entlehnungen, soweit sie in der Dissertation nicht ausdrücklich als solche mit Angabe der betreffenden Schrift bezeichnet sind, nicht stattgefunden haben.

Frankfurt am Main, den

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Elisabeth Ziesché
Geburtsdatum: 25. Februar 1980
Geburtsort: Dessau (Anhalt)
Familienstand: ledig

Beruflicher Werdegang

06/2008 bis heute wissenschaftliche Mitarbeiterin an der 3. Medizinischen Klinik (Prof. Dr. Christoph Huber) der Uniklinik Mainz in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Thomas Fischer / OA Dr. Thomas Kindler

09/2005 bis 05/2008 Promotion am Institut für Allgemeine Pharmakologie und Toxikologie (Prof. Dr. Josef Pfeilschifter) der Uniklinik Frankfurt in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Heiko Mühl

Schulische Ausbildung und Hochschulstudium

10/2001 – 08/2005 Biologiestudium an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
Wahlfächer: Biochemie, Pharmakologie, Medizinische Mikrobiologie
Abschluß: Diplom (Note: sehr gut)
Thema der Diplomarbeit: Regulation von EGFR, ERK1/2 und PKB/Akt durch den muscarinischen M3-Acetylcholinrezeptor in COS7-Zellen (Betreuer: Prof. Dr. Claus Liebmann)

10/1998 – 09/2001 Biologiestudium an der Martin-Luther-Universität Halle (Vordiplom)

08/1991 – 07/1998 Fürst-Franz-Gymnasium Dessau
Abschluß: Abitur (Note: 1,6)

09/1986 – 07/1991 III. Polytechnische Oberschule Dessau

Praktika

06/2001 – 08/2001 Praktikum am IPK Gatersleben
AG Molekulare Pflanzenphysiologie

07/1998 Praktikum am Robert-Koch-Institut Wernigerode

Qualifikationen

GMP für Biotechnologen (23./24.03.2007)
GLP für Biotechnologen (04./05.05.2007)
Sicherheit in der Gentechnik (04./05.12.2006)
Einführung in tierexperimentelles Arbeiten (07./08.02.2008)

Vorträge, Poster, Publikationen

Vorträge: 47. Frühjahrstagung der DGPT in Mainz (06.04.2006)
49. Frühjahrstagung der DGPT in Mainz (13.03.2008)

Poster: 14th International AEK Cancer Congress in Frankfurt
(28.02.-02.03.2007)

Publikationen: Stirnweiss J., Valkova C., **Ziesché E.**, Drube S., Liebmann C.,
2006; Cell Signaling; 18 (8): 1338-49

Ziesché E., Bachmann M., Kleinert H., Pfeilschifter J., Mühl H.,
2007; J Biol Chem; 282 (22): 16006-15

Interessen und Engagement

Sprachen, Literatur, Ski fahren

Mitglied der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie (GBM)
Promotion im Rahmen des Graduiertenkollegs 1172 (Biologicals)